



News & Comment

Recent NMR developments for pharmaceutical research

Kwanghwan Lee

Bruker Korea Co., Ltd, 4F. KT Net, Pangyoro 338, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-400, Korea

Received Dec 10, 2015; Revised Jan 15, 2016; Accepted Feb 19, 2016

Abstract NMR spectrometer has been regarded as essential tool for structure elucidation in variable scientific field as like organic synthesis, natural product and macro protein research. Also NMR can be applied for defining dynamic behavior like ligand and receptor binding.

One of advantage of research with NMR is that to be great confident to confirm structure and the measured sample could be recovered. Nevertheless NMR also has a weak points than other spectroscopic methods that require a lot of time for interpreting acquired spectrum and running time due to low sensitivity.

For last two decade Bruker has developed hardware and software solution for overcome those weak points. In order to overcome low sensitivity Bruker introduced Cryo and Micro diameter probe head technology. And researcher can reduce the time for routine spectrum processing and interpretation works due to lots of introductions in software solutions for quantification, identification and statistics analysis.

With four examples, this article describing those new hardware and software solutions in field of recent pharmaceutical research as follows.

- New Horizons for NMR in the Biopharmaceutical Industry
- The development and application of solid-state NMR spectroscopy (SSNMR) in pharmaceutical analysis

- Assisted NMR Data Interpretation in Synthetic Chemistry
- Complete Analysis of New Psychoactive Substances Using NMR

Keywords NMR, SSNMR, Cryo, Biopharmaceutics

바이오 제약산업에서 NMR 응용

모노클론 항체- (Monoclonal antibodies) 는 바이오 제약산업의 주요한 관심 대상인 동시에 신약 개발 분야에 가장 전망 있고 흥미로운 주제중의 하나이다. 이러한 단백질들은 어떤 항원에 반응할 수 있게 설계될 수 있으며 대량생산 또한 가능하다. 현재까지 mAbs 3차원 구조를 규명하지 못하였는데 이는 거대한 분자량 때문이다. 예를 들어 NMR에서 얻어진 스펙트럼에서 많은 피크 overlap 때문에 해석이 힘들다. 추가적으로 바이오 시료의 2D NMR 실험을 위해서는 isotopic labeling 처리가 필요한데 이는 13C 과 15N 의 낮은 자연 존재량 때문이다. mAbs 의 3차원 구조를 규명하는 것은 신약으로서의 안전성과 효능 규명에 중요한 의미를 가지는데 이는 구조의 기능 사이에는 밀접한 관계가 있기 때문이다. 올바르지 않는 단백질 폴딩 현상은 예상치 못한 면역 반응과 같은 부작용들을

* Address correspondence to: Kwaghwon, Lee, Bruker Korea Co., Ltd, 4F. KT Net, Pangyoro 338, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-400, Korea, Tel: +82 31-726-7171, Fax: +82 31-726-0002; E-mail: Kwaghwon.Lee@bruker.com

만들어 낼 수 있다. 그리하여 품질관리 공정상의 mAbs 의 구조를 확인하는 방법 확립은 필수불가결한 것이다.

Monoclonal antibodies— Luke Arboast 와 그의 연구원들의 최근 연구는 NMR의 진보된기술로 이러한 도전을 해결 하기 위한 방법을 이끌 수 있음을 보여주고 있다. 이번 연구에서, 연구원들은 RM8670 이라 불리는 mAb 후보구조물질의 finger print 영역으로 메틸잔기를 선택 관측하였다. 시료는 isotopic labeling 전처리 없이 Bruker Avance III 900MHz NMR 에서 실험을 진행하였다. 장착된 3중공명 Cryoprobe 의 기술진보는 isotopic labeling 처리 없이 분석이 가능하게 되었다. 메틸 잔기 그룹 관측하는 연구는 ^{15}N isotope (0.37%) 보다 훨씬 많은 ^{13}C Isotope (1.1%) 측면에서 장점이 많다. 온전한 mAb 시료를 가지고 잘 알려진 실험 gsHSQC (gradient-selected, sensitivity-enhanced heteronuclear single quantum coherence) 2D NMR 스펙트럼을 얻어 냈으며, 이는 peak assign 과 분석하기에 충분하게 좋은 결과였다. 이를 위해 12시간의 실험을 수행하였다.



연구원들은 Fab 와 Fc 단백질 도메인으로 쪼갠 mAb 조각 시료에 대하여 같은 실험을 반복 하였다. 같은 실험이 아니라 현재는 단지 4~5시간의 실험 수행 외에도 연구원들은 이러한 조각들에서 얻어진 것과 순수한 mAb 에서 얻어진 NMR 스펙트럼 과 상당히 유사한 결과를 보이는 점을 밝혀냈다. 이는 NMR 결과에서 잘려진 조각 단백질들이 순수한 mAb 를 대신 할 수 있는 물질임을 암시한다고 연구원들은 기술하고 있다. 연구원들인 NMR 실험시간은 더 단축 될 수 있는 것을 발견하였다. 이는 빠른 획득 기술

(rapid acquisition techniques) 을 통해 가능한데 즉 NUS(Non Uniform Sampling) 을 이용하여 isotope labelling 을 하지 않은 NMR 실험 시간을 단축할 수 있다. 6개의 시료 테스트 중에서 가장 빠르게 얻어진 결과는 34분으로 이는 rapid acquisition 기술인 50% NUS 와 SOFAST-HMQC 실험을 사용하였다.

연구원들은, Analytical Chemistry 에 기고된, Non labelled 시료 측정을 가능하게 한 cryoprobe 과 high field NMR 을 통해 과거보다 뛰어난 실용적인 품질관리 수단이 될 수 있는 점을 보여주고 있다. 그들의 결과는 단백질 구조 동정이 필요한 다양한 바이오산업에서 응용 될 수 있음을 보여주고 있다.



고체 NMR을 이용한 제약분석의 개발 및 응용
(By G.bogt, former Product Development Manager, GlaxoSmithKline plc.)

제약 연구분야에서 고체상 NMR 기법의 응용 및 개발은 학교와 산업체에서 꾸준히 발전하고 있다. 특히 실제 실험 기법에서 고체 NMR실험 기법들이 확장 되고 이용 할 수 있게 된 점도 중요한 요인이다. 특히, high field NMR, homonuclear dipolar decoupling 실험들과 dynamic nuclear polarization (DNP) 의 기초한 실험들이 고체 제약 물질 뿐만 아니라 유기물질들 연구 활용이 많아지고 있다. 이러한 방법은 최근 개발들은 많은 다루지 않았던 핵종 이면서 제약연구 분야에서 공통관심사인 ^1H , ^{14}N , ^{17}O , and ^{35}Cl , 측정을

가능하게 하고 있으며 또한 다양한 구조 및 무정형 연구를 하기에 NMR 감도 향상도 많이 증가하였다. 그리고 magic-angle spinning (MAS) 과 static 기법은 꾸준히 활용되고 있다. 이번 시간에 소개할 내용은 제약연구에 많이 활용될 수 있는 최근 기법 두 가지로 요약될 수 있다 첫째는 homonuclear dipolar decoupling 을 포함한 high field ^1H 고체 NMR 두번째는 DNP를 이용한 고체 NMR 기법이다.

High Field ^1H SSNMR and Homo nuclear Dipolar Decoupling

– ^1H 고체NMR을 위한 high static field 사용은 관심 있는 제약물질 안의 수소결합의 영향 정보를 얻을 수 있게 된다. 이는 한 결정 격자 안에 두 개 이상의 구조 화합물이 존재하는 cocrystal 연구에 적합하다. 특정 약품과 함께 형성될 수 있는 cocrystal 의 다양성은 유연한 구조를 만들며, 몇몇 경우에는 특정 결정 형상의 원인이 되는 물리적 현상을 조정하는 능력을 보이기도 한다. 그리고 염기물질을 형성하지 않는 신약 후보물질 생성에 가능성을 가지고 있다. 예를 들어, (Figure 1.) ^1H 스펙트럼, 16.4T static field, 35kHz MAS rate 과 tenoxicam 신약의 4개의 cocrystals 스펙트럼은 ^{14}N , ^{17}O , and ^{35}Cl 등과 같이 낮은 자기회전 비율값을 가지는 핵종 측정이 가능한 2.5mm 이중공명 프로브 에서 얻어졌다.

스펙트럼은 향상된 resolution 으로 관심 있는 영역의 많은 ^1H peak 관측 되었다. 스펙트럼 상의 9 ~ 15ppm 영역은 일반적으로 수소결합 ^1H peak 들이 관측되는 구간으로 이는 cocrystal 연구의 중요한 부분이다. 왜냐하면, 특정상 내의 결정구조는 수소결합이 강한 영향을 미치기 때문이다. ^1H 고체 NMR 실험들은 cocrystal 구조가 형성 여부를 빠르게 평가 할 수 있게 해주는데 이때 수소결합 경향에 대한 정보도 같이 확인 할 수 있게 된다. 이 모든 정보는 crystal 구조 없이도 가능하게 된다. High field NMR 의 장점 외에 추가적으로 ^1H 스펙트럼에서 동종 핵종간의 쌍극자 디커플링 정보를 이용하는 것도 제약물질 연구에 많은 유용한 점이 많다. 관심 있는 많은 제약 물질들은 원거리 결합

정보가 부족한 무정형 구조가 많으며 XRAY crystallography 을 응용하는 것도 쉽지 않다. 이러한 분자 구조를 가지는 시료들은 ^1H 고체 NMR 을 이용한 연구가 더 유용한 정보를 얻을 수 있다. 무정형 quinapril hydrochloride 의 경우에는, DUMBO decoupling 실험을 통해 수소결합 peak 들이 나오는 스펙트럼 영역에서 적어도 2 개 peak 이 나오게 됨을 알 수 있다.

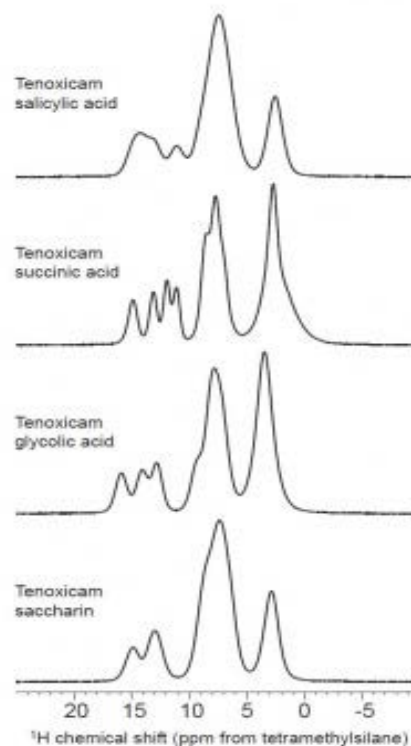


Figure 1. ^1H SSNMR spectra of four cocrystals of the drug tenoxicam at obtained at a MAS spinning rate of 35 kHz and a static magnetic field strength of 16.4 T. A measurement temperature of 283 K was used. For details about the interpretation of these spectra, see¹²

이는 무정형 고체 샘플에서 carboxylic acid 와 protonated amine 그룹의 상호 관련이 있을 가능성이 크다. 상세한 스펙트럼 해석 없이도, 이러한 관측 결과는 ^1H 고체 NMR 을 통해 무정형의 제약 물질 구조를 확인할 수 있게 해줌을 알 수 있다. High field NMR 에서 얻어지는 향상된 resolution 스펙트럼 정보와

쌍극자 디커플 실험들을 통해 $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 등의 연결 관계를 ^1H 와 2D NMR 방법으로 확인할 수 있다. 이는 crystal 구조 와 DFT chemical shielding calculation 을 이용하지 않아도 가능하다.^{4,5}

Dynamic Nuclear Polarization– DNP 기술 응용에서 얻게 되는 장점은 상당히 큰 감도증가 효과를 얻게 되며 이는 긴 T1 이완 시간을 가지는 microcrystalline 고체상 물질 및 무정형 유기 분자 연구들이 응용 예제가 될 수 있다. DNP NMR 의 가능성들을 보여주는 몇 가지 예제들 (Figure 3.)

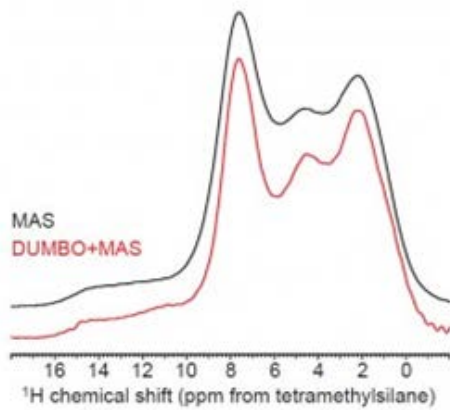


Figure 2. ^1H SSNMR spectra of amorphous quinapril hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) obtained using conventional MAS and with DUMBO dipolar decoupling at a static field of 16.4 T. The MAS spectrum and DUMBO spectrum were obtained using MAS rates of 35 and 30 kHz, respectively. A measurement temperature of 283 K was used.

polyvinylpyrrolidone (PVP)에 있는 30% (w/w) diflunisal 의 스펙트럼¹⁰을 cross-polarization (CP) MAS 방법과 비교했을 때 상당한 감도 증가 효과를 볼 수 있다.

마이크로 웨이브 조사 후에 무정형 신약에서 NS 16으로 얻어진 강한 peak 들이 ^{13}C 스펙트럼 100 에서 140 ppm 영역 안에 나오고 있다. 이는 빠르고 향상된 성능의 1D / 2D NMR 실험들을 얻을 수 있음을 보여주고 있다. 이러한 무정형 고체시료들의 실험

결과들은 신약개발 연구분야의 상당히 관심

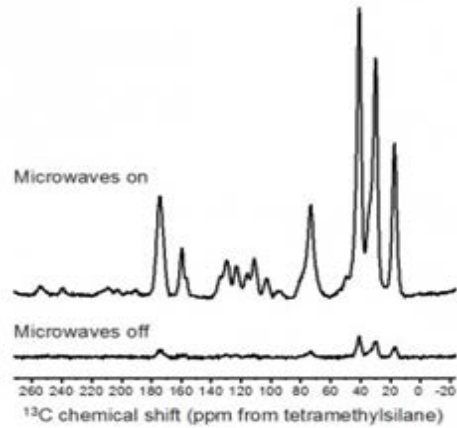
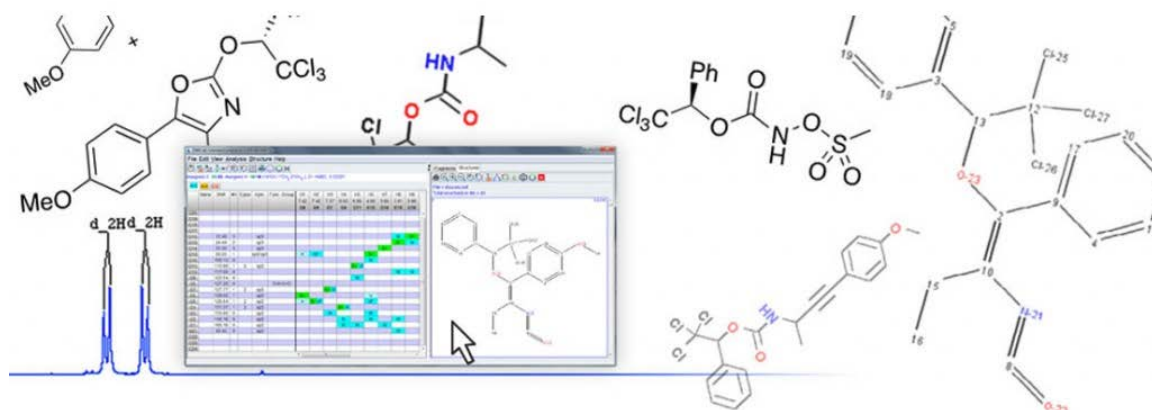


Figure 3. ^{13}C CP-MAS spectra obtained with DNP (microwaves on) and without DNP (microwaves off) of an amorphous solid dispersion containing 30% diflunisal in PVP¹⁰. The dispersion was impregnated with 16 mM of bCTbK radical (bis-TEMPO-bis-ketal, where TEMPO is (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl) oxidanyl) using 1,1,2,2-tetrachloroethane solvent (leading to signals in the 70-80 ppm region). Centerbands appear in the 180 to 10 ppm region. Each spectrum is the result of 16 scans. A relaxation delay of 7 s was used, during which DNP buildup occurs when microwave irradiation is applied. Spectra were obtained using a MAS rate of 8 kHz with a static field of 9.4 T. A measurement temperature of 100 K was used.

있는 영역으로 DNP 시스템을 이용한 ^{13}C 및 다른 저 감도의 타 핵종들의 스펙트럼들을 분석함으로써 유용한 구조 정보를 분석을 통해 가능하게 해준다.

미래 경향– 지금까지 기술된 내용들은 고체 NMR 의 최신 기법 중 일부분으로서 이 외에도 4 중극자 실험법, 신약후보물질 탐색, isotope labeling, 스펙트럼 예측 및 분석을 위한 계산 방법 과 2D NMR 이상의 스펙트럼 응용 등의 방법들이 상당히 발전 되었다.

이러한 열거된 방법들을 가지고 제약물질 연구 에 적용하며 신약 후보물질 구조 및 활성 규명 에 보다 정확한 정보를 얻을 수 있다. 고체 NMR 기법들이 발전함에 따라서, 신약 개발 연구 구도 같은 보조로 발전 할 수 있음을 기대할



수 있게 될 것이다.

촉매제 유기금속 화합물을 이용한 합성 기술의 발전 (by Johan Bartholoméüs¹, Martine Monette², Rajeev Kumar², Sandra Groscurth³, Hélène Lebel¹, ¹Université de Montreal, ²Bruker BioSpin Canada, ³Bruker BioSpin Switzerland)

몬트리올 대학교의 Prof. H el ene Lebel 연구실은 주 목적은 촉매제로서의 유기금속 화합물의 새로운 합성법을 개발 하는 것이다. 유기 및 유기금속 화학의 전문지식 외에도 NMR 분광기, 질량분석기, 엑스레이 결정 분석기 등의 활용이 합성 반응 경로 및 합성 산물 확인에 필수적이다.

Lebel 교수의 최근 연구내용은 C-H 삽입

반응과 새로운 chiral N-methanesulfonyloxycarbamate [1] 을 이용한 chiral amines 화합물 합성에 관한 것이다. 예를 들어 chiral rhodium dimer 존재 하여 reagent 2 과 alkyne 1 의 반응은 chiral amine 3 화합물을 높은 수율과 입체구조 선택성으로 얻을 수 있다.

이러한 propargylic C-H amination 반응은 대개 60-65% 의 수율로 얻고자 하는 합성 산물을 얻을 수 있으며, 이 과정에서 부산물 또한 얻어지는데 그 중의 한 물질은 5-10% 수율로 얻어진다. ¹H NMR 스펙트럼으로 확인된 ethyl 기뿐만 아니라 CCl₃ 그룹의 알파 프로톤 들은 alkyne moiety 와 함께 ¹H-azirine 4 형성 반응을 이끌며, 이는 oxazole 5 과 일치하는 구조의 재배열 및 형성으로 알려져 있다. NMR 스펙트럼을

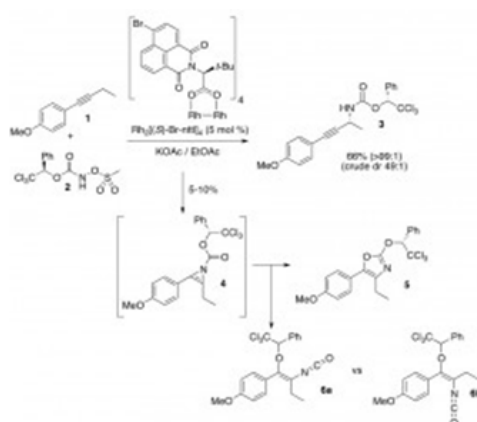


Figure 4. Stereo selective and region selective rhodium-catalyzed propargylic C-H amination reaction in micelles at 298 K.

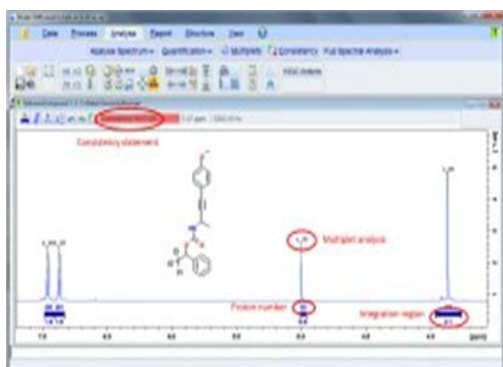


Figure 5. 1D ^1H spectrum analyzed by the automated structure verification software CMC-assist. Although the signals in the spectrum do not match the expected molecular structure, the spectrum gets analyzed with respect to peak integration, proton number determination and multiplet analysis.

해석하는 일은 꽤 복잡할 수 있으며, 수 mg 정도의 양으로 X-ray 분석을 위한 온전한 결정을 만드는 일도 또한 쉽지 않을 수 있다. 이러한 복잡한 일들 하지만 필수 불가결한 단순 작업의 해소를 위하여 Bruker 는 사용자 상호작용하며 NMR data 해석을 돕는 강력한 소프트웨어를 개발 하였다. 대다수의 경우에 반응 산물을 확인하는 과정은 질량분석기 나 1D ^1H 스펙트럼 위주의 NMR 결과 해석으로 가능하다. Bruker 의 CMC(Complete Molecular Confidence)-assist 소프트웨어 솔루션의 도움으로 1D NMR proton 스펙트럼은 간단한 버튼 클릭으로 프로세싱 과 스펙트럼 해석이 가능하다. 수동적으로 적당한 방법으로 스펙트럼을 프로세싱 후에 peak assign 을 진행하는 대신에 CMC-assist 소프트웨어는 이러한 스펙트럼 분석작업들과

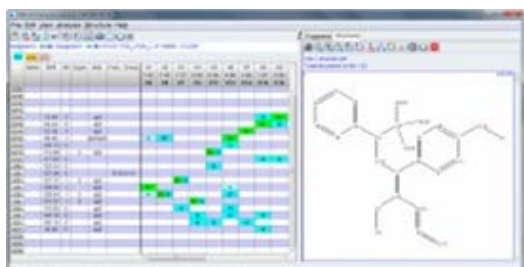


Figure 6. Complete structure elucidation assisted by the software CMC-se

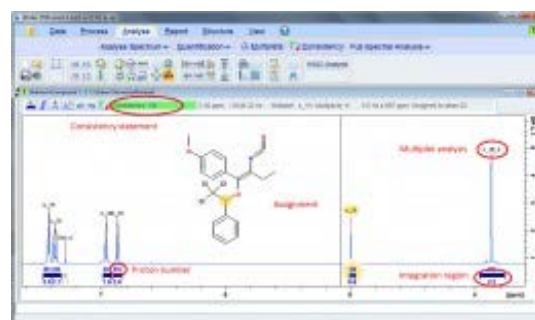


Figure 7. 1D ^1H spectrum analyzed by the automated structure verification software CMC-assist

그리고 관련된 결과 리포트도 수집 초안에 얻을 수 있게 된다. 입체 특이 반응의 경우 (Figure 4.), 자동 스펙트럼 해석 결과는 구조3을 확인 하였으나 실험 결과와는 맞지 않았다.

실제 합성 산물 여부를 확인하기 위하여 정확한 구조분석 과정을 수행하였다. 1D ^{13}C , HSQC, HMBC and COSY 스펙트럼과 같은 추가 정보에 기초를 두고 CMC-se 소프트웨어는 얻어진 스펙트럼을 자동 분석 즉, 원자간 연결관계를 해석하여 실험적인 데이터에서 얻어지는 가능성 있는 구조들을 만들어 주게 된다. 이러한 소프트웨어 기반 구조분석 방법은 여전히 수동적인 추가 보정이 필요함에도 불구하고 최종 구조 확인까지 소프트웨어 활용인 시간단축 시킬 수 있으며 또한 얻은 스펙트럼 편집을 용이하게 수행할 수 있으며 구조를 확인할 수 있다.

Amination 반응으로 얻어진 부산물 (초기에 5번구조로 구조 확인) 경우에는 CMC-se 쉽게 실제 합성된 화합물 구조를 확인하였다. CMC-assist 소프트웨어는 최근 반응물을 구조를 자동으로 확인하여 스펙트럼과 예상 구조가 일치함을 보여 주었다.

부산물 구조는 oxazole 5 대신에 Isocyanate



6a 로 확인 되었다. 이 정보는 Prof. Lebel 연구팀에게 이해되는 결과이며, ¹H-azirine 4의 예상된 구조 재배열이며 이러한 결론들은 연구팀으로 하여금 새로운 합성 반응 경로를 만들어 낼 수 있었다. Prof. Lebel 연구중의 하나인 새로운 합성전략 개발을 위해 수행한 입체구조 선택 유기 반응은 유기화학 연구원들의 일상적 업무 예시를 보여주고 있다. 요즘의 합성은 화학에서 꽤 복잡한 일이라고 여겨지고 이상적으로 합성 화학자들은 NMR 패키지는 신뢰 있게 NMR 스펙트럼을 분석하며 분석 데이터 해석 속도를 상당히 단축시킨다.

화합물의 정성 및 정량 프로세스에 어떻게 응용되고 있는지를 소개하고자 한다.

Ketamine - Confirming Regioisomerism

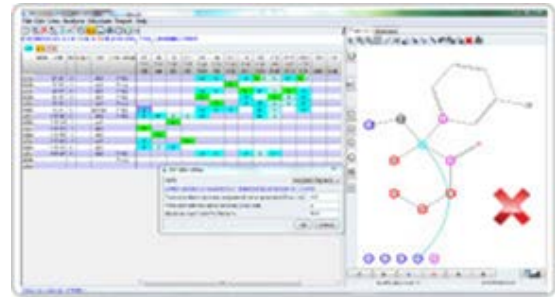


Figure 9. CMC-Se software for structure elucidation.

Class B 화합물과 배제된 이성질체의 구조를 확인하기 위하여 NMR이 케타민 분석을 위해 사용 되었다. 확인은 CMC-se 구조계산 소프트웨어로 수행 하였으며 HMBC 결과도 함께 분석하였다. Figure. 9에 새로운 구조

NMR을 이용한 향정신성 물질의 분석

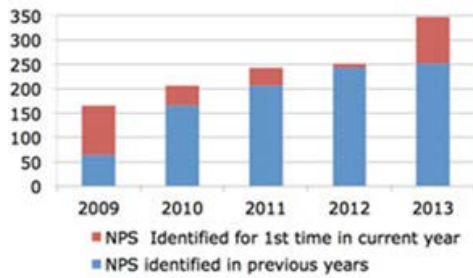


Figure 8. 현재와 작년의 처음으로 확인된 NPS 통계.

매년, 새로운 다량의 향정신성 물질(NPS)이 규제 없이 생기고 생산되고 있다. 소비자들 합법적으로 구매할 수 있는 이러한 물질은 건강을 해칠 수 있다는 점에서 의료 및 법계에 숙제를 주고 있다. 법적으로 허용 가능한 것과 불법적인 물질 사이에는 상당한 구조상의 유사성이 존재 하는데 이는 분석기기 결과를 가지고 확실하게 구분하는 것이 가능할 수 있다. 여기서 소개될 내용은 두 가지 합법과 불법적인 물질차이 구분하는 일을 NMR이 얼마나 필수적인 장비인지를 소개하고자 한다. 소개될 내용은 DOSY(Diffusion Ordered Spectroscopy) 실험이 구조계산 소프트웨어와 함께 어떻게 헤로인과 같이 합성 마약을 만들어 낼 수 있는 다양한 화합물들의 구조를 확인 할 수 있는지를 보여주고 있다. 또한 얻어진 구조정보가 마약에 존재하는

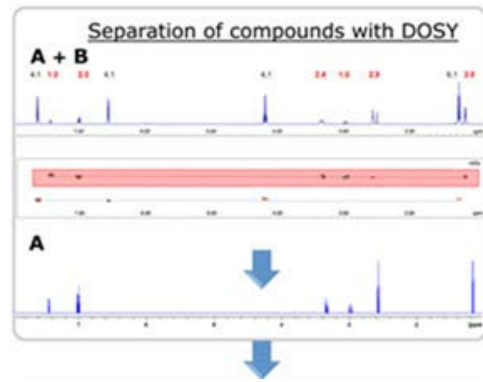


Figure 10. DOSY spectrum.

그리는 기능도 이용하였다. Figure 10.은 DOSY 결과로서 화합물 A와 B로 분리된 것을 보여주며, 그리고 CMC-se 소프트웨어의 구조 계산 과정을 수행하였다. 화합물 B의 구조 규명을 위하여 같은 방법을 적용한 결과 benzocaine 이라는 것을 확인하였다. Benzocaine 과 Methiopropamine 의 구조의 NMR 스펙트럼이 데이터 베이스에 저장되었다. 혼합물 안의 화합물들 정성 및 정량분석을 위해 Assure Raw Material Screening (Assure RMS) 방법이 개발

되었으며 이는 NMR 실험부터 결과 보고서 작성까지 과정을 자동으로 처리 할 수 있게 한다. 이러한 새로운 Assure RMS 방법을

가지고 헤로인의 다른 종류의 추가적인 분석을 버튼 클릭 한번으로 진행할 수 있었다. 이는 상당한 시간 단축 효과가 있다.

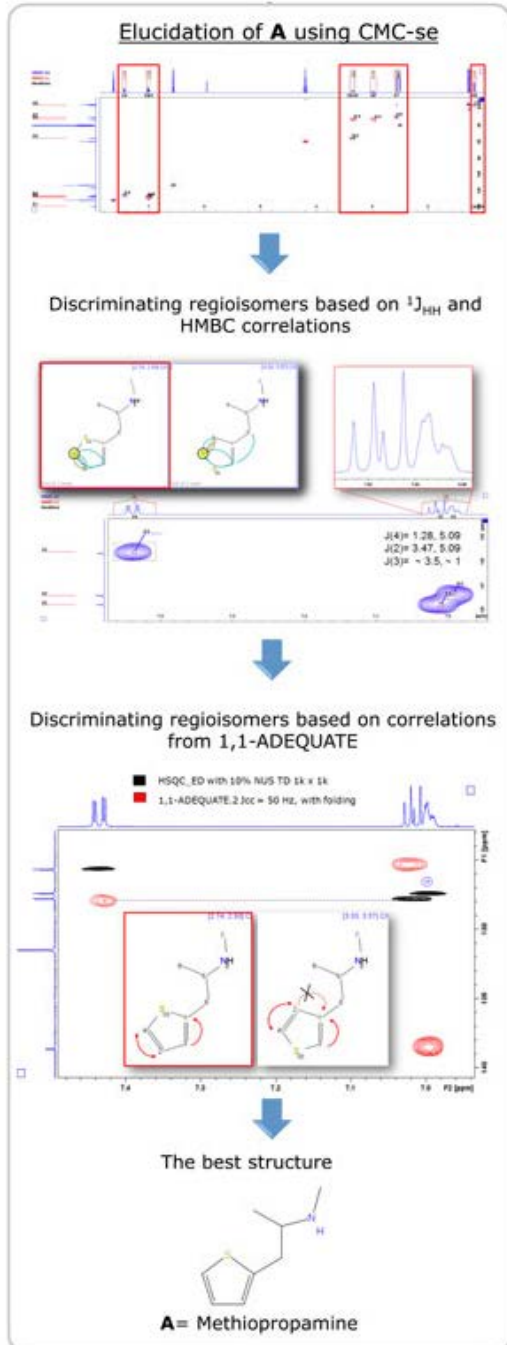


Figure 11. Structure conformation out of DOSY spectrum and CMC-Se.

결론

NMR 은 NPS 의 온전한 분석에 필수적인 장비이다. CMC-se 소프트웨어를 이용한 NPS 분석은 다수의 장점이 있는데 예를 들면 NPS 의 구조확인 및 이성질체 구분이 가능하다. 또한 편견 및 터널효과를 배제할 수 있으며 완전한 화학세계를 탐험 할 수 있게 한다. NPS 혼합물의 분석의 방법은 혼합물 분리를 위한 DOSY 및 화합물 구조분석을 위한 CMC-se 그리고 화합물 확인, 데이터베이스 처리 및 정량 분석을 위한 Assure RMS 로 설명할 수 있다.

Acknowledgements

Dr. Shane Pawsey and Dr. Jochem Struppe (Bruker Biospin) are thanked for experimental assistance and for providing data. Produced from materials authored by Anna Codina¹, Peter Gierth¹, Chris Stapleton¹, Andrew Kirkham¹, Julia Smith¹, Nicola Tonge¹, Nora Kouris¹, Brian Marquez², Andrew Gibbs¹ and John Ramsey³. (¹Bruker UK Limited, Banner Lane, Coventry, CV4 9GH, UK; ²Bruker BioSpin, 15 Fortune Drive, Billerica MA 01821, USA; ³TICTAC Communications Ltd.)

References

1. L. W. Arbogast, R. G. Brinson and J. P. Marino, *Analytical Chemistry* **87**, 3556-3561 (2015)
2. S. Goswami, W. Wang, T. Arakawa, et al, *Antibodie*. **2**, 452-500 (2013)
3. L. Poppe, J. B. Jordan, G. Rogers, et al, *Analytical Chemistry* **87**, 5539-5545 (2015)
4. M. Geppi, G. Mollica, S. Borsacchi, and C. A. Veracini, *Applied Spectroscopy Reviews* **43**, 202-302 (2008)
5. F. G. Vogt, *Future Medicinal Chemistry* **2**, 915-921 (2010)
6. P. K. Madhu, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **35**, 2-11 (2009)
7. A. J. Rossini, A. Zagdoun, F. Hegner, M. Schwarzwald, D. Gajan, C. Coperet, A. Lesage, and L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 16899-16908 (2012)
8. T. C. Ong, M. L. Mak-Jurkauskas, J. J. Walish, V. K. Michaelis, B. Corzilius, A. A. Smith, A. M. Clausen, J. C. Cheetham, T. M. Swager, and R. G. Griffin, *J. Phys. Chem. B.* **117**, 3040-3046 (2013)
9. A. S. Tatton, T. N. Pham, F. G. Vogt, D. Iuga, A. J. Edwards, and S. P. Brown, *Mol. Pharm.* **10**, 999-1007 (2013)
10. F. G. Vogt, H. Yin, R. G. Forcino, and L. Wu, *Mol. Pharm.* **10**, 3433-3446 (2013)
11. H. Hamaed, J. M. Pawlowski, B. F. T. Cooper, R. Q. Fu, S. H. Eichhorn, and R. W. Schurko, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11056-11065 (2008)
12. J. R. Patel, R. A. Carlton, T. E. Needham, C. O. Chichester, and F. G. Vogt, *Int. J. Pharm.* **436**, 685-706 (2012)
13. M. Rosay, L. Tometich, S. Pawsey, R. Bader, R. Schauwecker, M. Blank, P. M. Borchard, S. R. Cauffman, K. L. Felch, R. T. Weber, R. J. Temkin, R. G. Griffin, and W. E. Maas, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 5850-5860 (2010)
14. H. Lebel, C. Trudel, and C. Spitz, *Chem Commun.* **48**, 7799 (2012)
15. 'Global Synthetic Drugs Assessment' report, UNODC, http://www.unodc.org/documents/southeastasiaan-dpacific/2014/05/gsda/2014_Global_Synthetic_Drugs_Assessment_embargoed_Tokyo_web.pdf, accessed 18 Dec 2014.
16. <http://www.bruker.com/products/mr/nmr/nmr-software/software/complete-molecular-confidence/cmc-se/overview.html>, accessed 18 Dec 2014.
17. <http://www.bruker.com/products/mr/nmr/nmr-software/software/assure/overview.html>, accessed 18 Dec 2014.