



Porfiryny i ftalocyjaniny. Cz. I. Właściwości i niektóre zastosowania

Mariusz Trytek¹, Magdalena Makarska², Katarzyna Polska²,
Stanisław Radzki², Jan Fiedurek¹

¹ Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

² Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Porphyrins and phthalocyanines. Part I. Properties and some applications

Summary

Nowadays, the chemistry of porphyrins, phthalocyanines and related compounds (usually named as tetrapyrrolic rings) is one of the most interesting and promising subjects of supramolecular chemistry, because of unique photoactive properties of the porphyrin rings and their ability of electron transfer. The possibility of synthesis of tetrapyrroles with countless organic groups substituted to nine reactive centers of porphyrin ring and synthesis of complexes with almost all metal ions and, additionally, easy to modify the molecular structure of such obtained compounds give a chance of using the porphyrins in many different areas of life. In this paper, we present the most significant problems concerning porphyrins and their metal complexes, such as the molecular structures and physicochemical properties. We also show the most interesting applications, including the role of porphyrins as photosensitizers in photolysis of water and in photodynamic therapy (PDT).

Key words:

porphyrins, phthalocyanines, metalloporphyrins, metallophthalocyanines, PDT (Photodynamic Therapy), water photolysis.

Adres do korespondencji

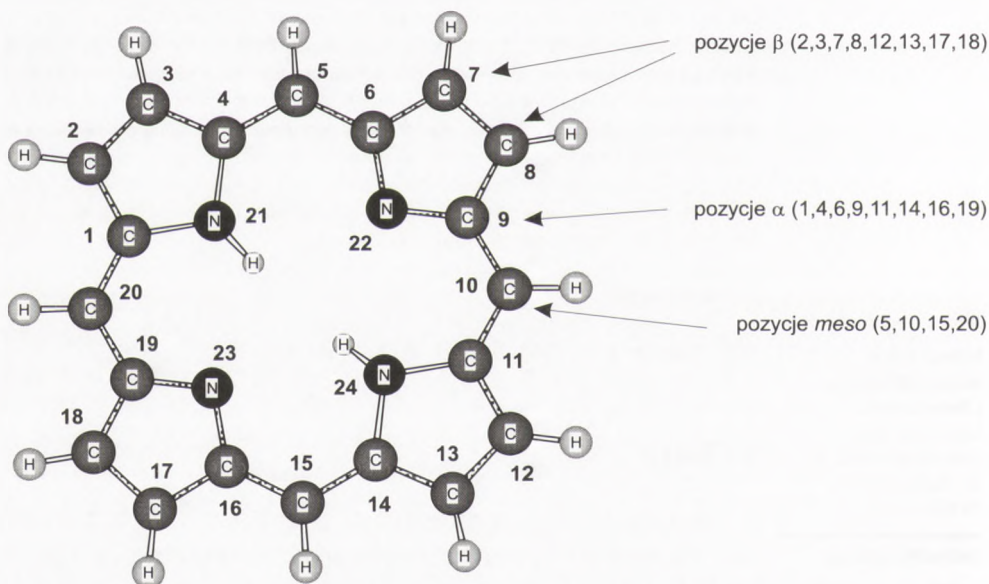
Mariusz Trytek,
Instytut Mikrobiologii
i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin.

1. Wstęp

Historia porfiryn rozpoczęła się w 1912 r., kiedy Wiliam Küster udowodnił obecność czterech pierścieni pirolowych w porfirynie (1), chociaż trzeba tu sprawiedliwie wspomnieć wielkiego

Emila Fischera, który pierwszy odkrył, że w wyizolowanym z krwi kompleksie żelaza zwanym heminą, występuje pierścień pirolowy. W przeciwieństwie do porfiryn, ftalocyjaniny zawierające cztery pierścienie indolowe nie występują w produktach naturalnych, a odkryto je przypadkowo w 1928 r. w szkockiej fabryce barwników (2). Badania dotyczące związków porfiryńowych i ich analogów (w tym ftalocyjanin) spotkały się z olbrzymim zainteresowaniem, o czym świadczy ogromna liczba artykułów. Tak duża i ciągle wzrastająca liczba prac wynika z zasadniczej roli, jaką związki z makrocyklem porfiryńowym odgrywają w przyrodzie i naszym życiu. Wydawnictwo John Wiley & Sons rozpoczęło w 1997 r. edycję czasopisma *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, a początkowo 4-tomowa monografia, rozrosła się do 20. tomów (3,4).

Porfiryny i ftalocyjaniny ulegają wielu typom przemian chemicznych, takim jak: reakcje koordynacji, polimeryzacji, agregacji, utleniania i redukcji; biorą czynny udział w procesach katalizy, sorpcji oraz w przemianach fotochemicznych. Dzięki specyficznym właściwościom spektroskopowym, magnetycznym, luminescencyjnym, a co najważniejsze, z racji zdolności do fotoprzewodnictwa i fotoemisji, porfiryny stały się niezbędnym elementem w procesie ewolucji organizmów żywych. Spełniają one w przyrodzie różne funkcje, takie jak: transport i magazynowanie O_2 (hemoglobina/mioglobina), metaboliczne utlenianie substancji organicznych (peroksydazy i cytochrom P_{450}), transfer elektronów (cytochromy b i c) oraz redukcja O_2 do wody (cytochrom a).

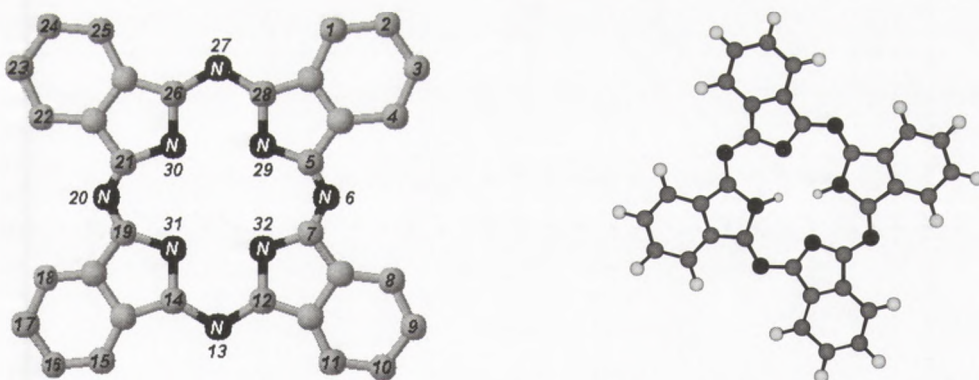


Rys. 1. Budowa pierścienia porfiryńowego (numeracja atomów według IUPAC).

2. Budowa cząsteczki

Cząsteczka porfiryny występuje w postaci charakterystycznego makrocyklu aromatycznego, złożonego z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi (rys. 1). W przypadku ftalocyjaniny będącej szczególnym rodzajem porfiryny, są to cztery pierścienie indolowe połączone mostkami azometinowymi (rys. 2). Połączone poprzez mostki pierścienie, zarówno pirolowe jak i indolowe, tworzą układ sprzężonych wiązań podwójnych zawierających 18 zdelokalizowanych elektronów π , spełniający regułę aromaticzności Hückle'a ($4n + 2$) dla $n = 4$. Pierścienie pirolowe lub indolowe budują zamkniętą, aromatyczną płaszczyznę, stanowiącą jądro związku. Płaski pierścień może jednak ulec deformacji, na przykład w wyniku chelatowania jonu metalu, który zastępuje atomy wodoru w grupach imidowych. Możliwych jest wiele sposobów numeracji atomów w makrocyklu porfirynewym, obecnie ogólnie przyjęta jest numeracja rekomendowana przez IUPAC, chociaż w literaturze popularny jest również sposób określania miejsc podstawników za pomocą greckich liter α i β , a także przedrostka *meso*.


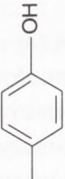
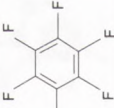
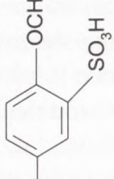
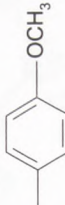
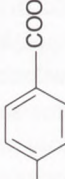
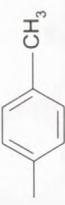
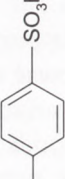
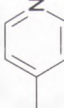
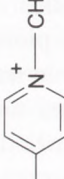
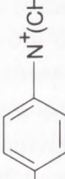
Do głównego pierścienia porfiryny przyłączają się zazwyczaj podstawniki, przy czym podstawienie następuje w pozycjach β lub *meso*. Porfiryny i ftalocyjaniny są związkami nie rozpuszczającymi się w wodzie, jednak wprowadzenie do pierścienia odpowiednich podstawników umożliwi w mniejszym lub większym stopniu ich rozpuszczalność, przy jednoczesnym zachowaniu wszystkich właściwości charakterystycznych dla tej grupy związków chemicznych. Porfiryny rozpuszczalne w wodzie, ze względu na rodzaj podstawnika dzielimy na anionowe i kationowe. Porfiryny anionowe występują zazwyczaj w postaci soli sodowych, zaś porfiryny kationowe zawierają grupy *p*-metylosulfonianowe (tosylanowe) lub jodki neutralizujące jon dodatni. W tabeli zaprezentowano przykłady *meso* podstawników; są to jednocześnie związki mające największe znaczenie w chemii porfiryń.



Rys. 2. Budowa cząsteczki ftalocyjaniny (numeracja atomów według IUPAC).

Tabela

Wybrane przykłady podstawników porfiryn rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie

| Porfiryny nierozpuszczalne w wodzie | | Porfiryny rozpuszczalne w wodzie | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| podstawnik | nazwa związku | podstawnik | nazwa związku |
|  | <i>meso</i> -tetrafeniloporfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis(4-hydroksyfenilo)porfiryna |
|  | <i>meso</i> -tetrakis(pentafluorofenilo)porfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis(4-metoksy-3-sulfonofenilo)-porfiryna |
|  | <i>meso</i> -tetrakis(metoksyfenilo)-porfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis(4-karboksyfenilo)porfiryna |
|  | <i>meso</i> -tetrakis(metylofenilo)-porfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis(4-sulfonofenilo)porfiryna |
|  | <i>meso</i> -tetra(4-pirydylo)porfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis(N-metylo-4-pirydylo)porfiryna |
| $\text{—CH}_2\text{—CH}_3$ | 2,3,7,8,12,13,17,18-oktaetylporfiryna |  | <i>meso</i> -tetrakis[4-(trimetyloamino)fenilo]-porfiryna |

Poszczególne układy porfiryne, choć zbudowane według podobnego schematu, mogą się różnić kilkoma elementami:

1) charakterem grup mostkujących, występujących pomiędzy pirolami (są to grupy: $-\text{CH}=\text{}$, $=\text{C}(\text{R})-$, $-\text{N}=\text{}$ lub ich wzajemne kombinacje);

2) rodzajem podstawników (wprowadzanych w miejsce atomów wodoru przy węglach piroli i mostkach metinowych), którymi mogą być: $-\text{H}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$;

3) możliwością uwodornienia jednego lub kilku wiązań podwójnych w pierścieniach pirolowych i zamykania sąsiadujących podstawników w nowy pierścień;

4) rodzajem jonów metali lub niemetalu przyłączonych w miejsce atomów wodoru grup imidowych piroli lub indoli.

Z kolei ftalocyjanina może być podstawiona w pozycjach 1-4, 8-11, 15-18 i 22-25 różnymi podstawnikami, jak np. grupami alkilowymi, aryłowymi, halogenowymi, nitrowymi, aminowymi, sulfonowymi czy karboksylowymi. Oddzielną grupę stanowią kondensacyjne analogi ftalocyjanin, do których należą również porfirazyny, a w których do benzenu pierścieni indolowych dołączone są kolejne pierścienie benzenowe, jak na przykład naftalocyjaniny, antracyjaniny czy fenantrocyjaniny. Możliwe są też takie pochodne ftalocyjanin, w których w miejsce benzenu indolowego wprowadzone są różne podstawniki.

Należy podkreślić, że dwa stosunkowo proste związki makrocykliczne, cztery pierścienie pirolowe albo indolowe połączone mostkami metinowymi lub azowymi stwarzają możliwość otrzymania milionów związków chemicznych o różnych właściwościach, których „jądrem” jest płaszczyna N_4 lub N_8 .

3. Właściwości fizykochemiczne i reaktywność

Najważniejszymi cechami charakteryzującymi porfiryny i ftalocyjaniny są ich unikatowe właściwości spektroskopowe, luminescencyjne (fluorescencja i fosforescencja), magnetyczne (para- i diamagnetyzm), a także ich trwałość termiczna, fotoprzewodnictwo, fotoemisja oraz aktywność powierzchniowa. Jedną ze specyficznych cech porfiryn jest ich wysoki molowy współczynnik absorpcji, rzędu 10^4 - 10^6 , implikujący zastosowanie w eksperymentalnych badaniach fizykochemicznych właściwości tych związków, przede wszystkim metod spektrofotometrycznych. Obecność tak silnego chromoforu, jakim jest porfiryne, powoduje, że w widmie kompleksu nie można obserwować pasm absorpcji jonów metali, które tym samym nie zakłócają obrazu badanych porfiryn. Równie często do charakterystyki porfiryn wykorzystuje się też inne techniki – NMR, magnetyczny dichroizm kołowy, czy pomiary widm wzbudzenia i emisji (5,6).

Porfiryny i ftalocyjaniny to związki bardzo reaktywne, ulegające różnego typu reakcjom – koordynacji, polimeryzacji, agregacji, tworzeniu kwasów, zasad i soli, reakcjom redoks, katalizie, sorpcji oraz reakcjom fotochemicznym. W reakcji chemicznej mogą brać udział różne części pierścienia porfiryneowego:

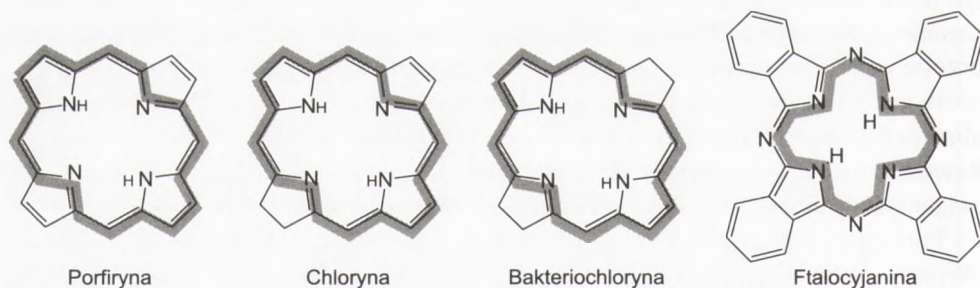
- dwa centra o charakterze kwasowym N – H,
- dwa atomy = N – mające wolne pary elektronowe,
- nienasycone wiązania etylenowe – CH = CH –,
- π -elektronowy makrocykl $C_{12}H_4$ lub $C_{32}H_{18}N_8$.

Pierwsze 4 centra odpowiadają za kwasowo-zasadowe właściwości porfiryn oraz stanowią chelatowy węzeł koordynacyjny. Tworząc związki kompleksowe z metalami, porfiryra traci 2 protony z wiązań N-H i jest koordynowana do metalu przez 4 równocenne atomy N.

Przyłączenie 2 lub 4 atomów wodoru przez rozerwanie wiązań podwójnych pierścieni pirolowych daje w rezultacie zredukowane porfiryry, tak zwane wodoroporfiryry (chlorynę, bakteriochlorynę, izobakteriochlorynę), które zachowują układ 18 elektronów π i charakter aromatyczny (rys. 3). Najważniejszą cechą porfiryn dla ich funkcji w przyrodzie, a także do ich wykorzystania jako katalizatorów biomimetycznych, jest możliwość utlenienia lub redukcji cyklicznego polienu (zaznaczonego na rys. 3), będącego podstawą wszystkich pierścieni porfiryrynowych i ftalocyjaninowych.

Poprzez utlenienie lub redukcję π -elektronowego pierścienia porfiryrynowego lub ftalocyjaninowego uzyskuje się π -kationy i π -aniony. Powstają one w wyniku oderwania lub przyłączenia elektronu z 18-elektronowego układu aromatycznego porfiryrynowego makrocykla. Trwałe π -kationowe i π -anionowe rodniki i transfer elektronów między nimi, przy jednoczesnym uwzględnieniu transferu elektronów wynikającego ze zmiany stopnia utlenienia metalu w makrocyklu, odgrywają podstawową rolę w przemianach chlorofilu, cytochromów i hemu, umożliwiając ich funkcje w transporcie energii w układach biologicznych.

Duża liczba centrów reakcji i podstawników prowadzi do powstawania wielu związków chemicznych zawierających układ pierścieni pirolowych. Najbardziej typowymi reakcjami, w których powstają te związki, są: zmiany podstawników i ligandów aksjalnych, procesy kompleksowania metali, protonowania, dimeryzacji, aglomeracji oraz utleniania i redukcji makrocykla.



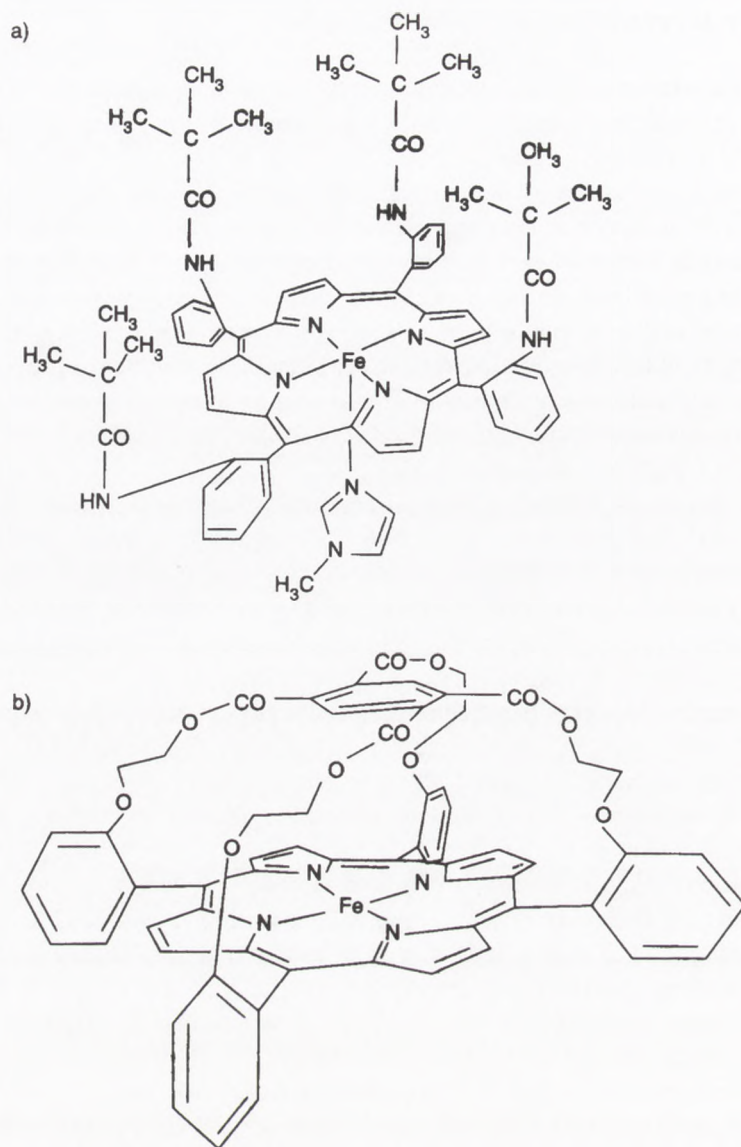
Rys. 3. Budowa cząsteczkowa pierścieni z zaznaczonym cyklicznym polienu zawierającym 18 elektronów π .

4. Niektóre kierunki badań i ich znaczenie

Doskonale wiadomo, że naturalne porfiryny odgrywają podstawową rolę w przyrodzie. Nie jest możliwe istnienie roślin i organizmów żywych bez takich związków jak: chlorofil (porfiryne magnezu), hem (porfiryne żelaza), cytochromy (porfiryny żelaza, wewnątrzkomórkowe katalizatory reakcji redoks), peroksydazy (enzymy utleniające związki organiczne i nieorganiczne za pomocą H_2O_2 i związków pokrewnych), czy układy korynowe (kobalaminy – witamina B_{12} – i koenzymy korynowe). Związki te odpowiedzialne są za procesy warunkujące funkcjonowanie organizmów żywych, uczestnicząc aktywnie w procesach fotosyntezy, oddychania komórkowego, fermentacji, w transporcie elektronów, w transporcie, akumulowaniu i wymianie gazów, regulacji i sterowaniu metabolizmem oraz pigmentacji tkanek. Zaburzenia w ich funkcjonowaniu prowadzić mogą do groźnych chorób, takich jak patologie krwi (anemia i porfirie) czy nowotwory.

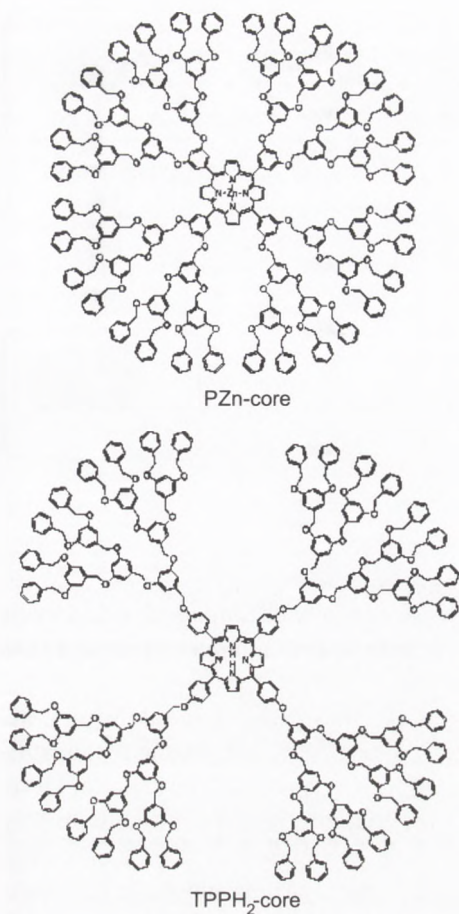
Badania dotyczące budowy i fizykochemicznych właściwości porfiryn występujących w przyrodzie doprowadziły do syntezy sztucznych układów porfirynowych. Duże zróżnicowanie takich układów pozwala na wykorzystanie ich w wielu dziedzinach nauki i przemysłu. Porfiryny i ich kompleksy z metalami mają obecnie zastosowanie w produkcji specyficznych barwników, półprzewodników, czy katalizatorów różnego typu reakcji. Pełnią rolę odczynników analitycznych przy spektrofotometrycznym oznaczaniu metali (np. oznaczanie $Cu(II)$ za pomocą porfiryn w wodach naturalnych (7) i we krwi (8)), uczestniczą w reakcjach utleniania i redukcji, w procesie fotosterylizacji wody (9,10), pełnią też rolę „elektronicznego nosa” – czujnika na lotne związki organiczne (11-13). Równie przydatne okazały się porfiryny w medycynie, gdzie stosowane są do leczenia niektórych infekcji bakteryjnych (14,15); natomiast metaloporfiryne wykorzystuje się jako kontrast w rezonansie magnetycznym (16). Od końca lat siedemdziesiątych dokonuje się prób otrzymania syntetycznych ligandów porfirynowych, które będą stanowiły model hemoglobiny zdolny do całkowicie odwracalnego przyłączenia tlenu (17). Do tej pory, w tej roli, znane są bowiem tylko porfiryne kompleksy żelaza (II), ale ponieważ żelazo (II) ulega utlenieniu do żelaza (III), wiążą one tlen nieodwracalnie. Być może całkowicie odwracalny model hemoglobiny powstanie w oparciu na porfiryinach pokazanych na rysunkach 4.

Niektóre porfiryny mają zdolność oddziaływania z DNA i RNA, powodując blokowanie odpowiednich jego fragmentów oraz zarówno chemiczne, jak i fotochemiczne rozszczepianie cząsteczki DNA – w związku z tym mogą służyć jako potencjalne czynniki antywirusowe (19). Szczególnie przydatne są tu, jak się wydaje, porfiryny kationowe. Z kolei porfiryny anionowe, również rozpuszczalne w wodzie, nie powodują rozszczepienia DNA i RNA, mimo że mogą one fotosensybilizować wytworzenie tlenu singletowego, w takim samym stopniu jak porfiryny kationowe (20,21). Okazało się, że kompleksy porfiryne pirydylowej z metalami można wykorzystać też jako sondę w łańcuchu RNA, ponieważ ich oddziaływanie z łańcuchami nukleotydów jest silniejsze w porównaniu z oddziaływaniem wolnej porfiryne (22,23).



Rys. 4. Modele cząsteczki hemu: a) „palisadowy”, b) „czapkowy” (18).

Interesujące są także, jak się wydaje, połączenia porfiryn z różnymi innymi związkami, takimi jak cyklodekstryny (24,25) oraz fulereny (26), a także porfiryny o rozszerzonej budowie cząsteczki, np. teksapiryny (27-30), „koła porfiryne” (31), szafiryny, szmaragdyny i inne (32). W badaniach porfiryn zmierza się także w kierunku syntezy układów wielopłaszczyznowych – przykładem mogą być koplarnarne diporfiryny.

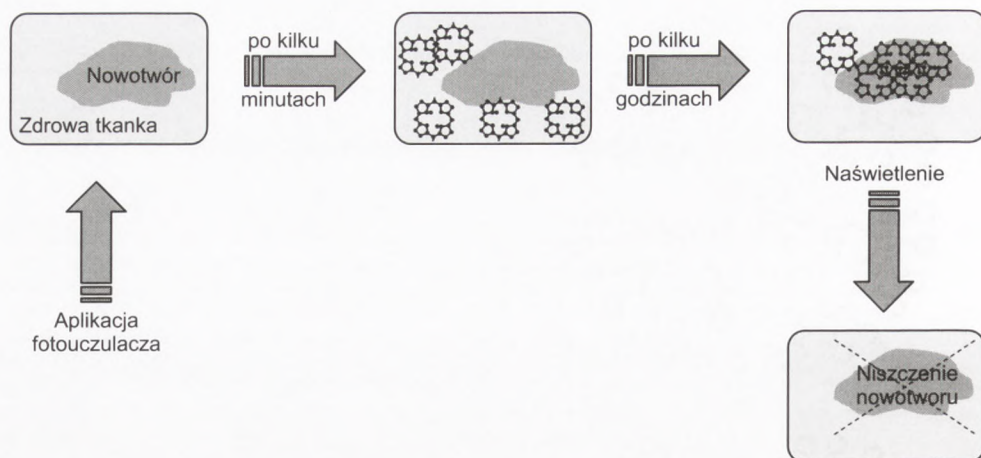


Rys. 5. Przykład dendrymerów trzeciej generacji, których jądrem jest tetrafenyloporfiryne (TPPH₂) lub jej kompleks z cynkiem (ZnP) (33).

Porfiryny mogą także uczestniczyć w tworzeniu bardzo skomplikowanych układów. Jednym z nich są struktury arboralne, zwane dendrymerami (rys. 5), wykazujące duże podobieństwo do sieci neuronowej. Takie związki biorą udział w tworzeniu dużych aglomeratów, zachowując prawdopodobnie swoje właściwości mimo zniszczenia części molekuly (tak jak sieć neuronowa) (33).

5. PDT – najważniejsze zastosowanie porfiryn i ftalocyjanin

Porfiryny wykazują zdolność do selektywnego gromadzenia się w tkankach nowotworowych. Po wzbudzeniu tak nagromadzonych cząsteczek przez światło można zapoczątkować kaskadę reakcji chemicznych, prowadzących do zniszczenia tych tkanek. Zjawisko to znalazło zastosowanie w nowoczesnych metodach wykrywania i leczenia nowotworów. Metody te, zwane terapią fotodynamiczną PDT (*Photodyna-*



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie mechanizmu PDT.

mic Therapy) i diagnostyką fotodynamiczną PDD (*Photodynamic Diagnosis*), odznaczają się szeregiem bardzo istotnych zalet, które korzystnie wyróżniają je spośród stosowanych obecnie technik terapeutycznych (34,35).

Diagnostyka PDD polega na wywołaniu zjawiska fluorescencji indukowanej. Reakcje te wywołują specjalne barwniki (głównie z grupy porfiryń), zwane fotouczulaczami, wzbudzone promieniowaniem laserowym lub innymi źródłami światła. Metoda PDD daje możliwość wysoce wybiórczej identyfikacji zmiany nowotworowej, dzięki selektywnemu gromadzeniu się fotouczulacza w zmienionej tkance oraz możliwości precyzyjnego naświetlenia tej zmiany za pomocą promieniowania laserowego. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem PDD w wykrywaniu innych zmian chorobowych; przykładem może być diagnostyka zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych (36).

Terapia PDT, przedstawiona schematycznie na rysunku 6, pozwala przede wszystkim na selektywne niszczenie tkanki nowotworowej, bez zbędnych uszkodzeń tkanek zdrowych. Terapia fotodynamiczna należy zatem do metod stosunkowo niskoinwazyjnych. Chociaż większość badań klinicznych nad PDT jest prowadzona pod kątem leczenia nowotworów, to potencjalne zastosowanie tej terapii w szeregu innych chorób jest ogromne. Ponieważ większość badanych fotouczulaczy selektywnie akumulują się w komórkach szybko dzielących się, aktywnych, to wszystkie choroby u podstaw których leży patologia związana z nadmiernym rozrostem tkanek, czy nadmiernym unaczynnieniem, są potencjalnymi kandydatami do leczenia za pomocą PDT. Należą do nich, m.in., miażdżycza tętnic, łuszczyca i reumatoidalne zapalenie stawów. Ważnym zastosowaniem PDT jest leczenie schorzeń oczu, na przykład zwyrodnienia starczego plamki, które jest jedną z częstszych przyczyn utraty wzroku. W tym przypadku niszczone są nieprawidłowe, zbyt rozrastające się

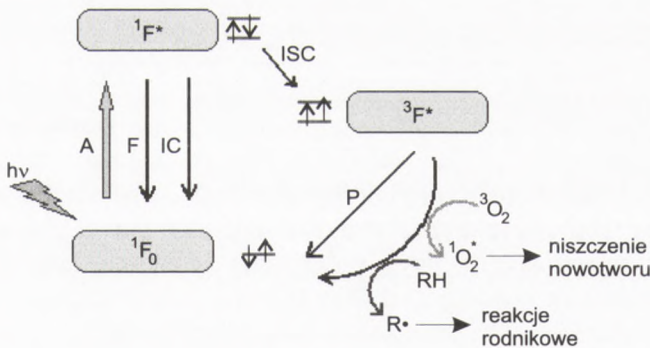
naczynia krwionośne pod siatkówką oka. Dzieje się tak również dzięki nagromadzeniu się w nich wcześniej podanych porfiryn, które następnie wzbudzone przez światło niszczą je, zahamowując proces degeneracji siatkówki (37).

Interesującą odmianą terapii PDT jest rozwijana w ostatnich latach fotodynamiczna terapia antybakteryjna PACT (*Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*). Tak jak PDT, opiera się ona na wykorzystaniu fotosensybilizatorów (głównie porfiryńowych) i naświetlaniu ich światłem widzialnym, bądź ultrafioletowym, w celu otrzymania odpowiedzi fototoksycznej, ale stosuje się ją raczej do unieczynniania wirusów, bakterii (szczególnie szczepów opornych na leki), drożdży i pasożytów (38).

5.1. Mechanizm procesu fotouczulania

Niszczenie tkanki nowotworowej następuje w procesie selektywnego fotoutlenienia, wymagającego trzech podstawowych składników: 1) fotouczulacza, zwanego też fotosensybilizatorem, który jest barwnikiem selektywnie gromadzącym się w tkance nowotworowej i uczulającym ją na działanie światła; 2) tlenu; 3) źródła światła emitującego fale spójne z pasmami absorpcji danego barwnika. Mechanizm działania fotosensybilizatora przedstawiono na rysunku 7.

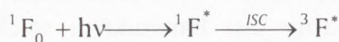
Wydajność procesu fotodynamicznego zależy w dużej mierze od lokalizacji barwnika w organellach komórkowych. Fotosensybilizator działa najefektywniej, jeśli jest przyłączany bezpośrednio do błony komórkowej lub do jakiegoś organellum komórki nowotworowej. Związane jest to z krótką drogą dyfuzji tlenu singletowego w materiale biologicznym (0,1 μm). Prowadzono również badania nad wpływem pH na aktywność uczulaczy, ponieważ pH wielu złośliwych nowotworów jest często wyraźnie niższe niż tkanek zdrowych. Niższe lokalne pH może być ważnym czynnikiem mającym wpływ na preferencyjne pochłanianie dwuanionowych pochodnych



Rys. 7. Mechanizm fotochemiczny PDT (A – absorpcja, F – fluorescencja, P – fosforescencja, IC – konwersja wewnętrzna, ISC – konwersja interkombinacyjna).

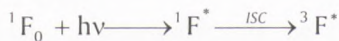
porfiryńowych. Po przejściu do wnętrza komórki przy pH~6,9 związki porfiryńowe występują w postaci mono- i dianionów, co blokuje im wyjście z komórki przez błony (34).

Cząsteczki fotouczulacza, pochłaniając światło o odpowiedniej długości fali, łatwo ulegają wzbudzeniu, a będąc w takiej postaci są zdolne do przekazania stanu wzbudzenia innym cząsteczkom, na przykład tlenu. Prowadzi to do powstawania wysoce reaktywnych, toksycznych dla komórek form tlenu, czyli wolnych rodników tlenowych, w tym tlenu singletowego (39). Tlen singletowy ($^1O_2^*$) powstaje z cząsteczki tlenu, będącego w podstawowym stanie tripletowym (3O_2), w wyniku przekazania energii od cząsteczki barwnika, będącej we wzbudzonym stanie tripletowym ($^3F^*$). Cząsteczka tlenu odbierając energię od cząsteczki fotouczulacza przechodzi w singletowy stan wzbudzony, a fotouczulacz wraca do swego stanu podstawowego (singletowego) (1F_0). Można to zapisać w postaci następujących równań:



Przejście cząsteczki barwnika będącego w stanie singletowym o krótkim czasie życia do niższego stanu wzbudzonego, jakim jest stan tripletowy, odbywa się przez konwersję interkombinacyjną ISC (*intersystem crossing*).

W warunkach, gdy stężenie tlenu w środowisku reakcji jest obniżone, reakcja fotoutleniania przebiega poprzez wytworzenie form wolnorodnikowych. Wolne rodniki fotouczulacza i substratu (FH i R) powstają w wyniku przeniesienia wodoru lub elektronu między cząsteczką wzbudzonego barwnika a substratem, czyli tkanką nowotworową, w której biegnie reakcja fotochemiczna. Mechanizm wzbudzenia oparty na przeniesieniu wodoru można opisać równaniami:



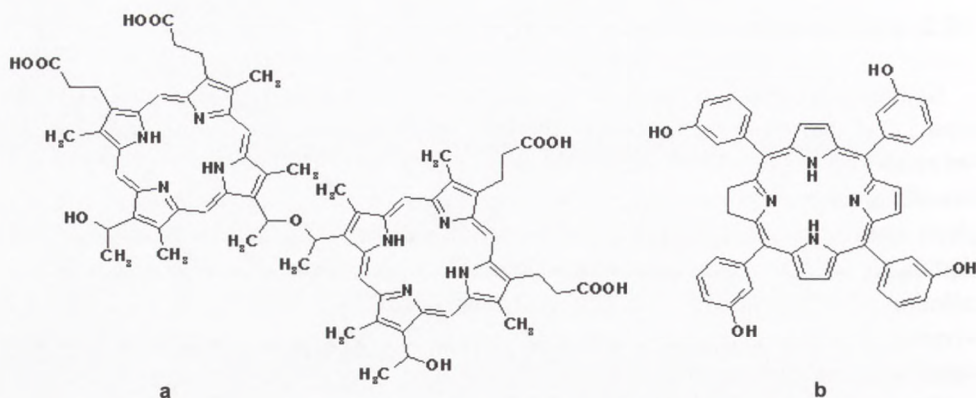
Z licznych badań wynika, że dominującym mechanizmem fotoutleniania jest ten, w wyniku którego tworzy się tlen singletowy. Jednak stosunek udziałów opisanych mechanizmów zależy od wielu czynników. Mogą nimi być parametry środowiska, takie jak stężenie tlenu, stałe dielektryczne tkanek, pH i inne. O typie mechanizmu może też decydować struktura barwnika. Okazuje się na przykład, że fotosensybilizatory ftalocyjaninowe wykazują większą tendencję do tworzenia form rodnikowych, zaś porfiryńowe do generacji tlenu singletowego (34).

5.2. Fotouczulacze stosowane w PDT

Najlepiej przebadaną grupą barwników są pochodne czerwonego barwnika krwi hemu, czyli barwniki porfiryne. Właściwości fototoksyczne endogennych porfiryne znano od czasu zdefiniowania choroby zwanej porfirią i od kiedy badacze próbowali zahamować rozwój tej choroby. Terminem porfirie określa się właściwie całą grupę chorób, w których porfiryny, w wyniku zaburzeń w ich metabolizmie, odkładają się w skórze, kościach i zębach. Wiele z tych pigmentów jest zupełnie nieszkodliwych w ciemności, lecz pod wpływem światła słonecznego przekształca się w cytotoksyczne, niszczące tkanki substancje, co wywołuje ostrą lub przewlekłą wrażliwość na światło (40).

Przebadane do tej pory fotosensybilizatory, ze względu na ich właściwości fizykochemiczne, można podzielić na trzy grupy: hydrofobowe, wykazujące preferencje do oddziaływania z lipidami; hydrofilowe, rozpuszczalne w wodzie (i kumulujące się w hydrofilnych strukturach komórki) oraz amfifilowe, zawierające w swej strukturze jednocześnie fragment hydrofobowy i fragment hydrofilowy. Ta ostatnia grupa barwników posiada, jak się wydaje, największe znaczenie kliniczne, ze względu na możliwości ich akumulacji zarówno w strukturach lipidowych, jak i hydrofilowych komórki. W zależności od zmodyfikowania pierścienia porfiryneowego poprzez podstawniki boczne, pochodne porfiryneowe występują we wszystkich trzech klasach fotouczulaczy. Do barwników amfifilowych należą pochodne porfiryneowe, mające różne łańcuchy boczne rozłożone niesymetrycznie wokół pierścienia makrocyclicznego. Najbardziej oddalony od podstawników bocznych fragment cząsteczki porfiryne, czyli makropierścień porfiryneowy, wykazuje właściwości hydrofobowe, zaś podstawniki, które posiadają grupy polarne, wykazują właściwości hydrofilowe.

Aby dany barwnik można było wykorzystywać jako fotosensybilizator w diagnostyce i leczeniu metodą fotodynamiczną, musi on spełniać kilka warunków: 1) musi selektywnie retencjonować się w tkance nowotworowej, przez co najmniej kilkadziesiąt godzin; 2) nie powinien dawać efektów fototoksycznych w zdrowych tkankach; 3) powinien wykazywać maksymalnie intensywne pasma absorpcji w „oknach” transmisyjnych tkanki, to znaczy pasma absorpcji fotosensybilizatora nie mogą pokrywać się z pasmami absorpcji barwników endogennych, takich jak melanina, hemoglobina, oksohemoglobina w obszarze widzialnym oraz z pasmami absorpcji wody w obszarze bliskiej podczerwieni; 4) powinien wykazywać w reakcji ze światłem wysoką wydajność tlenu singletowego lub rodnikowych form utleniających; 5) powinien stanowić jak najmniejsze źródło efektów ubocznych. Wymagania stawiane barwnikom, jak widać, są wysokie i trudno znaleźć takie związki, które jednocześnie spełniałyby wszystkie podane warunki. Pierwszym fotosensybilizatorem, który uzyskał atest FDA (*Food and Drug Administration*) w USA i jest obecnie używany w praktyce klinicznej w wielu krajach jest dimer hematoporfiryne znany pod nazwą handlową jako Photofrin (rys. 8) (41,42). Należy on do grupy **fotosensybilizatorów pierwszej generacji**. Ze względu na to, że leki takie jak Photofrin dość długo akumulują się w ko-

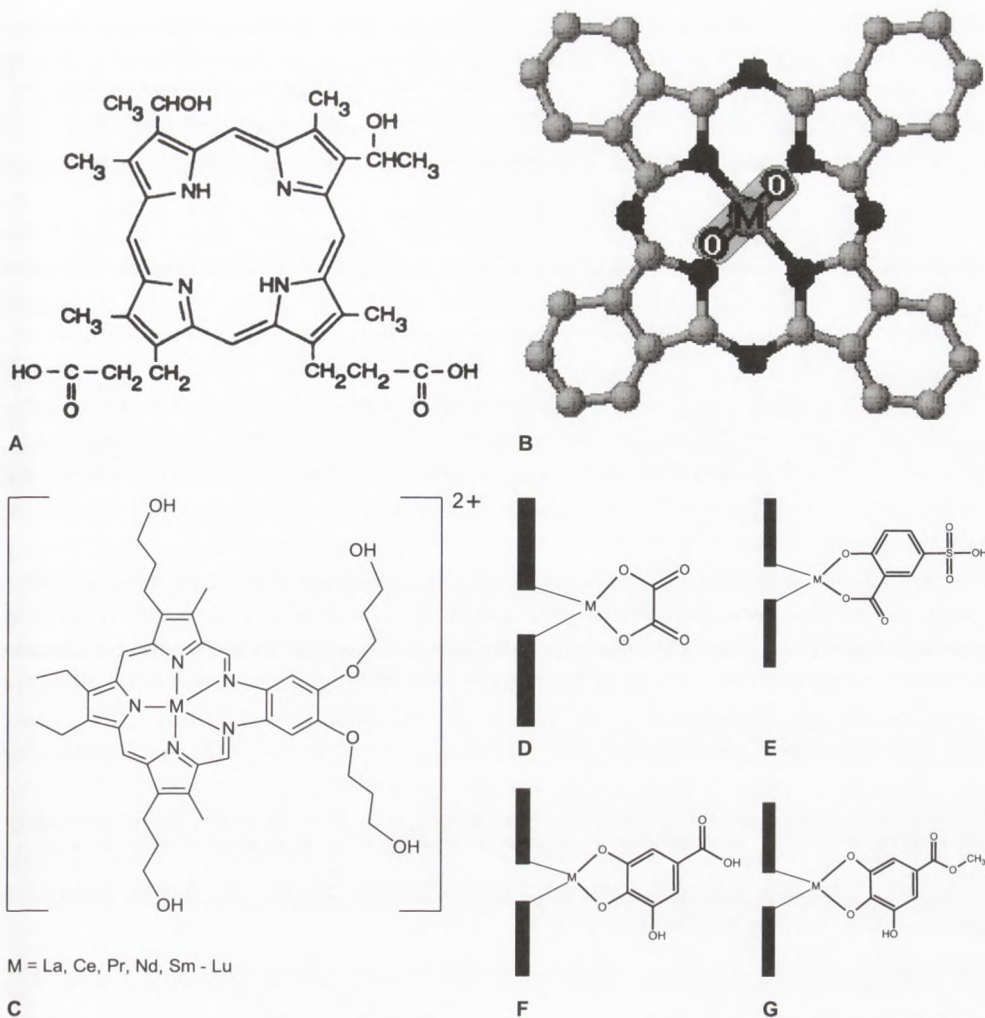


Rys. 8. Struktura fotosensybilizatorów porfiryńowych pierwszej generacji – Photofrinu® (a) i Foscanu® (b).

mórkach nowotworowych (do 48 h) i stosunkowo powoli są wymywane z organizmu, powodując przy tym wiele skutków ubocznych, takich jak na przykład nadwrażliwość na światło nawet do 6 tygodni, poszukuje się materiałów o lepszych parametrach klinicznych.

Przykładem **fotosensybilizatora drugiej generacji** może być pochodna benzo-porfiryń (BPD), która akumuluje się bardzo szybko w tkance nowotworowej (30-180 min), a przemijająca fotowrażliwość skóry po zastosowaniu tego leku trwa nie dłużej niż 2-3 dni (39). Innym szeroko badanym fotosensybilizatorem drugiej generacji jest mono-aspartylo-chloryna e₆ (MACE), wykazująca właściwości amfifilowe (43). Wyjątkowo liczne fotouczulacze tej grupy podzielić można na trzy klasy, według struktury makrocykla, na: porfiryń, zredukowane porfiryń (chloryny, bakteriochloryny, purpuryny) i tetraazaporfiryń (ftalocyjaniny, naftalocyjaniny) (44,45). Do najbardziej znanych sensybilizatorów drugiej generacji należą:

- H₂TPSP – tetrasulfoporfiryń rozpuszczalna w wodzie i jej kompleks z cynkiem;
- glikozydowane porfiryń – tetrafenyloporfiryń z laktozą i maltozą;
- ZnTSPc, czyli sulfonowana ftalocyjanina cynku, rozpuszczalna w wodzie dzięki podstawieniu jej grupami sulfonowymi;
- AlPcS – sulfonowany kompleks ftalocyjaniny z glinem jest już we Francji na etapie testów klinicznych;
- Ftalocyjaniny cyrkonu i hafnu Zr(IV)Pc i Hf(IV)Pc – rozpuszczalne w wodzie i DMSO dzięki specyficznym ligandom aksjalnym (rys. 9). Związki te w formie kremów były wstępnie testowane na Ukrainie do leczenia nowotworów skóry (46,47);
- pochodne (zmodyfikowane) porfiryń: purpuryny, metalopurpuryny, werdyny, teksapiryń (27-29) (rys. 9). Kompleksy teksapiryń z Gd i Lu mogą dodatkowo pełnić rolę kontrastów w metodzie MRI (*magnetic resonance imaging* – metoda diagnostyki popularnie zwana rezonansem magnetycznym), platyriny, benzoporfiryń



Rys. 9. Przykłady fotosensybilizatorów drugiej generacji: a) hematoporfiryna (syntetyczna o zdefiniowanej strukturze); b) teksafiryna (48); c) ftalocyjanina Zr(IV) i Hf(IV) w której ligandami aksjalnymi są: d) kwas szczawiowy; e) kwas sulfosalicylowy; f) kwas galusowy; g) ester metylowy kwasu galusowego.

(Verteporphin®), oraz zmodyfikowane chloryny, bakteriochloryny, naftalocyjaniny i ftalocyjaniny, metaloftalocyjaniny.

Wybiórcze powinowactwo porfiryn do tkanki nowotworowej okazało się dość iluzoryczne – związki te są bowiem pochłaniane przez wszystkie szybko rozwijające się tkanki, w tym także skórę, co prowadzi do działań niepożądanych związanych z jej nadwrażliwością na światło. Problem ten można pokonać, poprawiając selektywność akumulacji porfiryn w komórkach rakowych, na przykład przez połączenie ich z nośnikami posiadającymi również powinowactwo do tego typu komórek.

Tak zrodziła się nowa grupa fotosensybilizatorów zwana **trzecią generacją**. Idealny nośnik powinien umożliwiać selektywną akumulację sensybilizatora w chorej tkance w stężeniu terapeutycznym, a w otaczającej ją zdrowej tkance w bardzo małym stężeniu lub wcale. Nośnik nie może jednocześnie obniżać aktywności leku, musi być nietoksyczny i biodegradowalny. Istotne są również takie cechy nośnika, które ułatwiałyby całemu układowi wnikanie do komórek docelowych, uaktywniając się dopiero w nich, a nie w krwiobiegu. Bardzo istotnym czynnikiem przemawiającym dodatkowo za łączeniem porfiryn z innymi cząsteczkami jest ograniczenie zjawiska agregacji tych sensybilizatorów, które w stanie wolnym łączą się ze sobą, obniżając tym swą fototoksyczność. Wszystkie barwniki porfiryne mają większą lub mniejszą tendencję do agregacji, co wpływa na ich właściwości cytostatyczne. W licznych badaniach wykazano, że zdolność do produkcji wysokoutleniających mediów cytotoksycznych (tlen singletowy, wolne rodniki) maleje ze wzrostem stopnia agregacji, bowiem tylko monomery mogą wydajnie produkować tlen singletowy. Okazuje się natomiast, że w połączeniu z nośnikiem fotosensybilizator występuje przeważnie w formie monomeru (49-51).

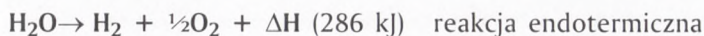
Jako układy nośnikowe stosuje się liposomy (52), micelle (53), przeciwciała monoklonalne (54), immunoglobuliny (55), albuminy osocza (45) i lipoproteiny o małej gęstości (LDL) (57). Dobranie odpowiedniego nośnika wiąże się oczywiście z charakterem fotouczulacza, na przykład lipoproteiny o niskiej gęstości, określane skrótem LDL, chętniej wiążą cząsteczki hydrofobowe (lipofilowe). Stwierdzono, że uzyskanie kompleksów LDL-barwnik znacznie zwiększa przyswajanie fotosensybilizatorów przez komórki nowotworowe. Dzieje się tak głównie dlatego, że w komórkach nowotworowych jest więcej receptorów lipoprotein o niskiej gęstości. Nośnikami, które można zastosować praktycznie do każdego typu fotouczulaczy, są przeciwciała monoklonalne. Stosując te połączenia można znacznie zmniejszyć dawkę barwnika, uzyskując ten sam efekt leczniczy (58).

6. Fotoliza wody

Od wielu już lat zagadnienie wykorzystania energii słonecznej do przeprowadzenia fotolizy wody, w wyniku której można by uzyskać wodór i tlen, stanowi wyzwanie dla wielu uczonych. Ciągle jednak nie udaje się zrealizować tego procesu w warunkach abiotycznych, jak zresztą również nie udało się odtworzyć naturalnej syntezy, chociaż badania problemów są liczne. Należy tu wymienić najważniejszych badaczy: Melvin Calvin (1967), George Porter (1967), Derek Barton (1969), Geoffrey Wilkinson (1973), Jean-Marie Lehn (1987) czy Rudolf Markus (1992). W nawiasach podano rok otrzymania nagrody Nobla. Produkowany w procesie fotolizy wodór mógłby być wykorzystany jako przyjazne środowisku, spalające się czysto paliwo, które dostarcza więcej energii, aniżeli spalanie paliw węglowodorowych czy węgla. Najważniejszym jednak problemem jest wyprodukowanie wodoru po cenie niższej,

aniżeli wynosi produkcja paliw konwencjonalnych. Dopiero bowiem wykorzystanie paliwa wodorowego otrzymanego w wyniku opłacalnej produkcji rozwiązałyby problemy skażenia środowiska oraz deficytu konwencjonalnych paliw.

Fotoliza wody, zwana również fotochemiczną redukcją wody, to przemiana energii słonecznej w energię chemiczną w wyniku fotokatalicznego rozkładu wody na O_2 i H_2 :



Promieniowanie widzialne nie jest jednak absorbowane przez wodę – światło słoneczne nie może być w związku z tym bezpośrednio użyte do rozkładu wody. Do przeprowadzenia reakcji potrzebny jest zatem odpowiedni układ chemiczny, złożony z sensybilizatora (fotouczulacza pełniącego rolę fotokatalizatora), donora elektronów, przekaźnika oraz katalizatora (koloidalna platyna lub platyna naniesiona na $SrTiO_3$). Najważniejszym elementem tego układu jest właściwie dobrany fotokatalizator, który może absorbować światło w odpowiednim zakresie długości fali λ , a uzyskany nadmiar energii wykorzystywać jako energię aktywacji reakcji. Rolę sensybilizatorów w procesie fotolizy mogłyby pełnić porfiryny, odbierając energię słoneczną i przekształcając ją we wzbudzone elektrony (58-60) – taką samą funkcję pełni podczas fotosyntezy chlorofil. Związki porfiryne są szczególnie predystynowane do tej roli, ze względu na wysoki stopień absorpcji światła oraz odpowiednio do fotochemicznego rozkładu wody potencjały redoks.

Intensywne badania fotolizy wody prowadzone są w National Renewable Energy Laboratory w Golden, Colorado. Publikowane przez ten instytut roczne raporty i sprawozdania z badań są dostępne w Internecie (61,62). W pracach tych wykorzystuje się porfiryny i ftalocyjaniny często w bardzo zaawansowanych technologicznie formach, jak na przykład półprzewodniki typu $Ga_{51}In_{49}P$ powlekane monowarstwą kompleksu oktaetyloporfiryny $Ru(IV)$ z grupami karbonylowymi w roli ligandów akcyjnych (63).

Jednak pomimo wielu wysiłków, przemysłowa fotoliza wody jest nadal marzeniem; jedynie Harrimanowi udało się przeprowadzić reakcję fotolitycznego otrzymywania wodoru z dużą wydajnością, tyle tylko, że przy użyciu promieniowania UV, a koszt wytworzenia tego promieniowania jest większy aniżeli wartość uzyskanej energii (59).

7. Podsumowanie

Nowatorskie technologie wymagają nowych i bardziej użytecznych rozwiązań. Jednym z nich jest na pewno zastosowanie materiałów organicznych, lekkich, wykazujących zdolności przewodzące i łatwo ulegających procesowi chemicznej modyfikacji. Unikatowe połączenie właściwości fotoaktywnych oraz zdolności do przeno-

szenia elektronów predestynuje do tego celu jedną z grup złożonych związków makrocyclicznych – porfiryny i ich analogi ftalocyjaniny. Ich specyficzne właściwości spektroskopowe, magnetyczne, luminescencyjne, a co najważniejsze, zdolność do fotoprzewodnictwa i fotoemisji, a przede wszystkim do transferu elektronów, są wykorzystane w przyrodzie. Dzięki wielu typom reakcji chemicznych, którym ulegają, takim jak: koordynacja, polimeryzacja, agregacja, utlenianie i redukcja, kataliza, sorpcja oraz przemiany fotochemiczne, porfiryny mogą znaleźć zastosowanie w różnych, często odległych od siebie dziedzinach – stosowane są przede wszystkim jako katalizatory różnego typu reakcji (w tym użytecznych biotechnologicznie), odczynniki analityczne, jako pigmenty i barwniki, półprzewodniki i fotoprzewodniki oraz sensybilizatory w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworów (PDT). W przyszłości planuje się również ich wykorzystanie w urządzeniach kumulujących energię konwencjonalną i energię słoneczną, bioczułnikach czy przełącznikach molekularnych. Nie omówiono tutaj katalitycznych i analitycznych zastosowań porfiryn, gdyż proste wyliczenie reakcji, które katalizują i substancji, które można oznaczać bezpośrednio z ich pomocą, bądź czujników i bioczułników optycznych lub elektrod jonoselektywnych z nich zbudowanych daleko przerosłoby objętość tego artykułu.

Literatura

1. Küster W., (1913), *Z. Physiol. Chem.*, 82, 463-483.
2. Lever A. B. P., (1965), *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, 7, 27-114.
3. *The Porphyrins*, (1978), Ed. Dolphin D., vol. 1-4, Academic Press, New York.
4. *The Porphyrin Handbook*, (2000), Eds. Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R., vol. 1-10; (2003-2004), vol. 11-20, Academic Press. (www.porphyrins.info)
5. Ng D. K., Jiang J., (1997), *Chem. Soc. Rev.*, 26, 433-442.
6. Milgrom L. R., (1997), *The colors of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds*, Oxford University Press, UK.
7. Tabata M., Kumamoto M., Nishimoto J., (1996), *Anal. Chem.*, 68, 758-762.
8. Makino T., Itoh J. I., (1981), *Clinica Chimica Acta*, 111, 1-8.
9. Połtowicz, Młodnicka T., (1995), *Metaloporfiryny jako katalizatory procesów utleniania*, Wyd. UW.
10. Spikes J. D., (1984), *Porphyrim Localization and Treatment of Tumors*, 170, 19-39.
11. Zhang X., Gao M., Kong X. J., (1994), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1055-1056.
12. Hayon J., Ozer D., Rishpon J., (1994), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 619-620.
13. Natale A. Di, Salimbeni D., Paolesse R., (2000), *Sensors & Actuators*, B, 65, 220-229.
14. Merchat M., Spikes J., Bertoloni G., (1996), *J. Photochem. Photobiol.*, B, 35, 149-157.
15. Malik Z., Hanania J., Nitzan Y., (1990), *J. Photochem. Photobiol.*, B, 5, 281-289.
16. van Zijl P. C., Place D. A., Cohen J. S., (1990), *Acta Radiol. Suppl.*, 374, 75-81.
17. Büchler J. W., (1978), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, 407-423.
18. Cotton F. A., Wilkinson G., (1980), *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York.
19. Han G., Yang P., (2002), *J. Inorg. Biochem.*, 91, 230-236.
20. Lee Y.-Ae., Lee S., Cho T.-S., Kim C., Han S. W., Kim S. K., (2002), *J. Phys. Chem.*, B, 106, 11351-11355.
21. Chen X., Liu M., (2003), *J. Inorg. Biochem.*, 94, 106-113.
22. Foster N., Singhal A. K., Smith M. W., Marcos N. G., Schray K. J., (1988), *Biochimica et Biophysica Acta*, 950, 118-131.

23. Radzki S., Krausz P., (1996), Monatshefte für Chemie, 127, 51-61.
24. Mosinger J., Deumie M., Lang K., (2000), J. Photochem. Photobiol., A, 130, 13-20.
25. Carofiglio T., Fornasier R., Gennari G., (1997), Tetrahedron Lett., 38, 7919-7922.
26. Nierengarten J. F., Schall C., Nicoud J. F., (1998), Angew. Chem. Int. Ed., 37, 1934-1936.
27. Lisowski J., Sessler J. L., Lynch V., (1995), J. Am. Chem. Soc., 117, 2273-2285.
28. Lisowski J., Sessler J. L., Mody T. D., (1995), Inorg. Chem., 34, 4336-4342.
29. Sessler J. L., Hemmi G., Mody T. D., (1994), Acc. Chem. Res., 27, 43-50.
30. Sessler J. L., Seidel D., (2003), Angew. Chem. Int. Ed., 42, 5134-5175.
31. Schenning A. P. H. J., Benneker F. B. G., Geurts H. P. M., (1996), J. Am. Chem. Soc., 118, 8549-8552.
32. Jasat A., Dolphin D., (1997), Chem. Rev., 97, 2267-2340.
33. Balzani V., Ceroni P., Juris A., Venturi M., Campagna S., Puntoriero F., Serroni S., (2001), Coord. Chem. Rev. 219-221, 547-572.
34. Graczyk A., (1999), *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa.
35. *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, (2004), red. Podbielska H., Sieroń A., Stręk W., Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław.
36. Biały D., Derkacz A., Wawrzyńska M., Smereka A., Bednarkiewicz A., Stręk W., Ziółkowski P., (2003), Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 9, 141-146.
37. Levy J. G., (1995), Trends Biotechnol., 13, 14-18.
38. Wainwright M., (1998), Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42, 13-28.
39. Fernandez J. M., Bilgin M. D., Grossweiner L. I., (1997), J. Photochem. Photobiol., B, 37, 131-141.
40. Batlle A. M. C., (1993), J. Photochem. Photobiol., B, 20, 2-22.
41. Schaffer M., Schaffer P. M., Corti L., Gardiman M., Sotti G., Hofstetter A., Jori G., Duhmke E., J., (2002), Photochem. Photobiol., B, 66, 157-164.
42. Chwiłkowska A., Sączko J., Modrzycka T., Marcinkowska A., Malarska A., Bielewicz J., Patalas D., Banaś T., (2003), Acta Biochim. Polon., 50, 509-513.
43. Nakamura J., Kajiwaru H., (1999), J. Hepatobiliary Pancreat. Surg., 6, 312-319.
44. Makarska M., (2001), *Charakterystyka związków kompleksowych kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie*, rozprawa doktorska, Wydział Chemii, UMCS, Lublin.
45. Momenteau M., Oulmi D., Maillard P., (1994), Photodynamic Therapy of Cancer II, 2325, 13-23.
46. Tomachynski L. A., Chernii V. Y., Volkov S. V., (2001), J. Porphyr. Phthalocya., 5, 731-739.
47. Chernii V. Ya., Tomachynski L.A., Gerasymchuk Yu. S., Radzki S.S., Volkov S.V., (2003), Ukr. Chim. Zhurn., 39, 9-10.
48. Sessler J. L., Mody T. D., Hemmi G. W., Lynch V., (1993), Inorg. Chem., 32, 3175-3186.
49. Konan Y. N., Gurny R., Allémann E., (2002), J. Photochem. Photobiol., B, 66, 89-106.
50. Ronn A. M., Nouri M., Abramson A. L., Pecci F., (1999), Med. Sci., 14, 307-318.
51. Lambert C. R., Reddi E., Spikes J. D., Rodgers M. A. J., Jori G., (1986), Photochem. Photobiol., 44, 595-601.
52. Derycke A. S. L., Witte P. A. M. de, Int., (2002), J. Oncology, 20, 181-187.
53. Zhang G. D., Harada A., Nishiyama N., lang D. L. J., Koyama H., Aida T., Kataoka K., (2003), J. Controlled Release, 93, 141-150.
54. Jiang F. J., Jiang S., Liu D., Ritcher A., Levy J. G., (1990), J. Immunol. Methods, 134, 139-149.
55. Brancalion L., Moseley H., (2002), Biophys. Chem., 96, 77-87.
56. Bárdos-Nagy I., Galántai R., Kaposi A. D., Fidy J., (1998), Int. J. Pharmaceutics, 175, 255-267.
57. Bonneau S., Vever-Bizet C., Molière P., Mazière J. C., Brault D., (2002), Biophys. J., 83, 3470-3481.
58. Łapkowski M., Szulbiński W., (1992), Wiadomości Chemiczne, 46, 305-342.
59. Darwent J. R., Douglas P., Harriman A., (1981), Coord. Chem. Rev., 44, 833-867.
60. Wasielewski M. R., (1992), Chem. Rev., 92, 435-462.
61. *Hydrogen, Fuel Cells, and Infrastructure Technologies Program*, (2002), Annual Progress Report, U.S. Department of Energy.
62. <http://www.nrel.gov/>
63. Warren S., (2001), *Increasing Efficiency in Photoelectrochemical Hydrogen Production*, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.