

## СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Научная статья  
УДК 543:678.01  
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-31-43>



# Метрологическое обеспечение в области изотермической калориметрии титрования: перспективы разработки стандартных образцов

К. А. Мишина  

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева», г. Санкт-Петербург, Россия  
 [k.a.mishina@vniim.ru](mailto:k.a.mishina@vniim.ru)

**Аннотация:** Изотермическая калориметрия титрования (ИТК) позволяет исследовать тепловые эффекты различных химических и физико-химических процессов, в том числе и процессов растворения. Данный метод является сравнительно новым. Поэтому активное расширение области его применения выявило ряд проблем. Например, в рассматриваемой статье поднимается проблема недостаточного метрологического обеспечения изотермических калориметров титрования, что приводит к несогласованности результатов, полученных на различных моделях калориметров, а также к их несоответствию литературным данным. Используемые в настоящее время электрическая и химическая процедуры калибровки калориметров не являются универсальными и имеют ряд ограничений при их применении. Целью настоящего исследования является выработка основных подходов к созданию сертифицированных стандартных образцов с аттестованным значением количества теплоты физико-химических взаимодействий с установленной метрологической прослеживаемостью к основным единицам SI.

В ходе выполнения исследования проведен анализ состояния метрологического обеспечения в области измерений ИТК, сформулированы основные требования к веществам – кандидатам на роль СО; оценена целевая неопределенность значения интегральной теплоты разведения растворов пропанола-1 путем анализа характеристик рабочих средств измерений, что позволило установить требования к методу измерений, применяемому для характеристики СО. Предложен и опробован метод определения аттестованного значения количества интегральной теплоты разведения, обеспечивающий прослеживаемость к государственному первичному специальному эталону единицы количества теплоты в области калориметрии растворения и реакций ГЭТ 133.

В перспективе для реализации проекта необходимо продолжение исследований с целью получения экспериментальных данных по характеристике, оценке однородности и стабильности материала СО, обработки полученных результатов и оценки неопределенности аттестованного значения, что позволит завершить разработку стандартных образцов.

**Ключевые слова:** изотермическая калориметрия титрования, неопределенность измерений, химическая калибровка ИКТ, стандартные образцы, эталон

**Используемые в статье сокращения:** ГЭТ 133-2012 – Государственный первичный специальный эталон единицы количества теплоты в области калориметрии растворения и реакций; СО – стандартный образец; СИ – средство измерений; ИКТ – изотермическая калориметрия титрования; СКО – среднее квадратическое отклонение.

**Ссылка при цитировании:** Мишина К. А. Метрологическое обеспечение в области изотермической калориметрии титрования: перспективы разработки стандартных образцов // Эталоны. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 3. С. 31–43. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-31-43>

Статья поступила в редакцию 29.11.2022; одобрена после рецензирования 22.02.2023; принята к публикации 25.04.2023.

## REFERENCE MATERIALS

Research Article

# Metrological Support in the Field of Isothermal Titration Calorimetry: Prospects for the Development of Reference Materials

Karina A. Mishina  

D. I. Mendeleev Institute for Metrology, St. Petersburg, Russia

 k. a.mishina@vniim.ru

**Abstract:** Isothermal titration calorimetry (ITC) allows studying the thermal effects of various chemical and physicochemical processes, including dissolution processes. This method is relatively new. Therefore, the active expansion of the scope of its application has revealed a number of problems. For instance, the article raises the problem of insufficient metrological support for isothermal titration calorimeters, which leads to inconsistency of the results obtained on different models of calorimeters, as well as their inconsistency with literature data. The current electrical and chemical calibration procedures for calorimeters are not universal and have a number of limitations in their application.

The purpose of the research is to develop basic approaches to the creation of certified reference materials with a certified value of heat of physicochemical interactions with established metrological traceability to the base SI units.

In the course of the study, the analysis of the state of metrological support in the field of ITC measurements was carried out, the main requirements for candidate substances to RMs were formulated; the target uncertainty of the value of the integral heat of dilution of propanol-1 solutions was estimated by analyzing the characteristics of working measuring instruments, which made it possible to establish requirements for the measurement method applied to characterize RMs. A method for determining the certified value of the integral heat of dilution that provides traceability to the State primary special standard of the unit of heat in the field of dissolution calorimetry and reactions GET 133 has been proposed and tested.

In order to implement the project, it is necessary to continue research in order to obtain experimental data on the characterization, assessment of the homogeneity and stability of the material, processing the obtained results, and estimating the uncertainty of the certified value, which will make it possible to complete the development of reference materials.

**Keywords:** isothermal titration calorimetry, measurement uncertainty, chemical calibration of ITC, reference materials, standard

**Abbreviations used:** GET 133-2012 – State primary special standard of the unit of heat in the field of dissolution calorimetry and reactions; RM – reference material; MI – measuring instrument; ICT – isothermal titration calorimetry; SD – standard deviation.

**For citation:** Mishina K. A. Metrological support in the field of isothermal titration calorimetry: prospects for the development of reference materials. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):31–43. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-31-43>

The article was submitted 29.11.2022; approved after reviewing 22.02.2023; accepted for publication 25.04.2023.

### Введение

Изотермическая калориметрия титрования – сравнительно новый метод исследования теплот химических и физико-химических взаимодействий, ставший массово коммерчески доступным с 1990-х гг. В последние годы методу изотермической калориметрии титрования (ИКТ)

уделялось большое внимание. Например, в таких работах, как [1–5] показано, что метод получил наиболее широкое распространение в химических, медицинских и биологических исследованиях.

Существенным преимуществом метода ИКТ является возможность изучить полный термодинамический

профиль процесса: константу связывания, изменение энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса – в результате одного эксперимента [2].

Ежегодно более чем в 500 публикациях приводятся результаты научных исследований, полученные с помощью метода ИКТ. Около 80 % этих публикаций касаются исследований взаимодействия биомолекул: протеинов с другими протеинами, ионами металлов, жирами, нуклеиновыми кислотами и углеводами [2–4]. При этом область применения ИКТ постоянно расширяется и включает также, например, кинетику энзимов и характеристику лекарственных средств, а в публикации Prozeller D. [5] упоминаются исследования взаимодействия протеинов с наночастицами.

В связи с активным расширением области применения, а также повышением требований к точности и достоверности результатов, получаемых методом ИКТ, повышается внимание к вопросам метрологического обеспечения изотермических калориметров титрования.

В настоящее время на практике преимущественно применяется электрическая калибровка калориметров с последующей верификацией при помощи химических и физико-химических взаимодействий, значения тепловых эффектов которых известны из литературных данных. Такие взаимодействия могут представлять собой химические реакции, процессы растворения чистых веществ или разведения их растворов, но в публикациях обозначаются в целом как «калибровочные», «тестовые» [6] или «стандартные реакции» [7]. В данной работе применяется термин «стандартные реакции».

Важно отметить, что текущая практика имеет существенные метрологические недостатки, упоминаемые в ряде публикаций. Например, авторами [8, 9] были отмечены существенные расхождения значений теплового эффекта реакции, полученных с применением разных моделей калориметров. Также авторы [8, 9] обращают внимание, что полученные значения отклоняются от приведенных в литературе [10, 11], причем в некоторых случаях это отклонение превышает заявленную неопределенность.

В работе [12] автор Myszka D. G. представил результаты межлабораторных сличений ABRF-MIRG, которые показали, что стандартное отклонение значения теплового эффекта реакции, полученного обработкой результатов участников, составило около 20 %, что значительно превысило оценки точности, заявленные лабораториями.

Некоторые исследователи [13, 14] связывают такую изменчивость с различиями в исходных материалах

и процедурах их подготовки, подчеркивают необходимость первичного стандарта, обладающего достаточной стабильностью и доступностью для пользователей, т. е. отвечающего требованиям к сертифицированным стандартным образцам.

Кроме того, сравнительные исследования электрической и химической процедур калибровки [13, 14], а также рекомендации Международного союза теоретической и прикладной химии ИЮПАК [6] показывают, что использование стандартных реакций при химической калибровке позволяет точнее определить эффективный объем ячейки и энергетический эквивалент калориметра.

Некоторые реакции, применение которых может быть обосновано в качестве стандартных, были предложены ИЮПАК в [6]. Однако возможность применения многих приведенных в литературе стандартных реакций ограничена в связи с несовпадением теплового эффекта реакции с рабочим диапазоном калориметра и областью применения, риском загрязнения шприца для подачи образца и измерительной ячейки, отсутствием коммерчески доступных материалов и т. д.

Использование стандартных реакций предусмотрено производителями средств измерений (СИ): компании MicroCal и TA Instruments в руководствах по эксплуатации микрокалориметров рекомендуют применять наборы реактивов собственного производства. Стоит отметить, что эти наборы не являются стандартными образцами, то есть их однородность и стабильность не гарантирована, как и прямая прослеживаемость «опорного» значения, в качестве которого принимаются данные из литературных источников. Также возникает вопрос, каким образом образцу присвоено приписанное значение и его неопределенность. Зачастую информация о способе установления этого значения, его прослеживаемости, методах обработки и получения исходных данных отсутствует.

Следует отметить, что данные из литературных источников [7, 8, 13, 16–17] можно применять в качестве референтных значений с некоторой осторожностью, поскольку ранее полученные результаты могли быть подвержены систематическим эффектам и представлены с существенно заниженной неопределенностью, например, по причине того, что не были учтены важные составляющие, такие как концентрация титранта.

Поэтому оценка неопределенности измерений изотермических калориметров титрования является актуальной проблемой, которая сейчас активно исследуется как производителями СИ [13], так и научными организациями [8, 17–20].

Анализ литературных данных и ФИФ ОЕИ<sup>1</sup> показал, что в настоящее время отсутствуют метрологические средства для обеспечения единства измерений в области калориметрии титрования. В связи с этим возникает необходимость разработки таких средств – стандартных образцов (СО) с аттестованным значением количества теплоты растворения, разведения и реакций, обеспечивающих прослеживаемость измерений к единицам СИ и предназначенных для поверки, и калибровки средств измерений, и контроля точности аттестованных и стандартизованных методик.

Целью настоящего исследования является выработка основных подходов к созданию сертифицированных стандартных образцов количества теплоты разведения с установленной метрологической прослеживаемостью к основным единицам СИ.

В задачи данного исследования входит следующее: теоретический анализ литературных источников; обоснование выбора веществ-кандидатов на роль СО; определение процедуры аттестации СО; проведение испытаний в целях утверждения типа; установление метрологических характеристик СО.

Для решения этих задач был подготовлен проект по разработке стандартных образцов количества теплоты. В ходе работ на основании анализа литературы были выбраны вещества-кандидаты, определены требования к ним и к целевой неопределенности СО, а также предложен метод измерений для оценки однородности и стабильности материала СО. В результате совершенствования ГЭТ 133-2012<sup>2</sup> были расширены его функциональные и измерительные возможности в область микрокалориметрических измерений, что позволило обеспечить возможность применения в качестве метода аттестации СО прямого метода измерений с применением оборудования из состава ГЭТ 133-2012. Данный метод был опробован на выбранных веществах-кандидатах для разработки СО.

## **Материалы и методы**

### ***Подготовка проекта***

Подготовка проекта была осуществлена с учетом рекомендаций ISO Guide 35. Разработанный план проекта

<sup>1</sup> ФИФ ОЕИ – Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений: официальный сайт.  
URL: <https://fgis.gost.ru>

<sup>2</sup> ГЭТ 133-2012 Государственный первичный специальный эталон единицы количества теплоты в области калориметрии растворения и реакций / институт-хранитель ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева» // ФИФ ОЕИ: официальный сайт.  
URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/12/items/3978212>

включает следующие этапы: определение материала СО; определение целевой неопределенности СО; планирование экспериментов, выбор и опробование методов и средств характеристики; планирование экспериментов и выбор методов и средств для исследований однородности и стабильности; исследования однородности и стабильности; характеристика СО; оценка неопределенности аттестованного значения.

Выбор материала СО был осуществлен на основании анализа литературных источников, описывающих применение стандартных реакций. В ходе анализа были рассмотрены преимущества и недостатки веществ, используемых для их реализации, а также практика их применения.

Оценка целевой неопределенности СО была проведена на основании анализа состояния области измерений и характеристик микрокалориметров, заявленных производителями, анализа результатов межлабораторных экспериментов и информации о метрологических характеристиках СИ, представленных в публикациях.

Планирование экспериментов, выбор и опробование методов и средств характеристики были осуществлены на основании оценки целевой неопределенности СО.

Выбор методов и средств для исследований однородности и стабильности был осуществлен на основании анализа стандартного отклонения измерений повторяемости при измерениях теплового эффекта реакции.

Исследования однородности и стабильности, характеристика СО и оценка неопределенности аттестованного значения запланированы в ходе дальнейших исследований.

## **Оборудование**

Для проведения предварительных экспериментальных исследований применяли эталонный микрокалориметр МКТ (ВНИИМ, Россия) и микрокалориметр-компаратор NanoITC SV (TA Instruments, США) из состава ГЭТ 133-2012.

Эталонный микрокалориметр МКТ представляет собой дифференциальный титрационный микрокалориметр теплового потока и состоит из измерительного калориметрического блока с двумя ячейками: измерительной и сравнительной, системы дозирования, системы управления температурным режимом, системы управления измерительным процессом и системы сбора и обработки информации. Для обработки экспериментальных данных применяется ПО OriginPro 2022b. Внешний вид микрокалориметра МКТ в сборке представлен на рис. 1.

Метрологические характеристики эталонного микрокалориметра МКТ: диапазон значений количества



Рис. 1. Эталонный микрокалориметр титрования MKT из состава ГЭТ 133-2012

Fig. 1. Reference microcalorimeter for titration MKT from GET 133-2012

теплоты, в котором воспроизводится единица в специальных условиях, среднее квадратическое отклонение

оценки измеряемой величины  $S_0$  при числе независимых измерений  $n$ , неисключенная систематическая погрешность  $\Theta_0$ , суммарное среднее квадратическое оценки измеряемой величины  $S_{0\Sigma}$ , доверительные границы погрешности оценки измеряемой величины  $\Delta_{0\Sigma}$ , стандартная неопределенность, оцененная по типу А,  $u_{0,A}$ , стандартная неопределенность, оцененная по типу В,  $u_{0,B}$ , суммарная стандартная неопределенность  $u_{0C}$  и расширенная неопределенность  $U_0$  при коэффициенте охвата  $k=2$  приведены в табл. 1.

### Материал – кандидат СО

При выборе материалов-кандидатов для разработки СО к ним были сформулированы базовые требования:

- материалы-кандидаты должны обеспечивать возможность проведения стандартной реакции с заданным тепловыделением в соответствующем диапазоне;
- материалы-кандидаты должны быть химически стабильными при хранении и пробоподготовке;
- материалы-кандидаты не должны вступать в побочные химические реакции с растворителем и материалами конструкции калориметра;
- материалы-кандидаты необходимой степени чистоты должны быть коммерчески доступны.

В целом проблемы выбора подходящих материалов достаточно подробно изучались и ранее и рассмотрены, например, в [6, 21]. Выводы данных работ, практика применения и результаты исследований стандартных реакций, как и сформулированные требования, были учтены в ходе выбора материалов-кандидатов для разработки СО.

Таблица 1. Метрологические характеристики эталонного микрокалориметра MKT из состава ГЭТ 133-2012  
Table 1. Metrological characteristics of the reference microcalorimeter MKT from GET 133-2012

Погрешность измерений					
Наименование физической величины	Диапазон значений, мкДж	$S_0$ , %	$\Theta_0$ , % при $P=0,95$	$S_{0\Sigma}$ , %	$\Delta_{0\Sigma}$ , % при $P=0,95$
Количество теплоты	100–5000	0,2 ÷ 4,0 ( $n=10$ )	0,8 ÷ 2,9	0,5 ÷ 4,3	1,0 ÷ 8,6
Неопределенность измерений					
Наименование физической величины	Диапазон значений, мкДж	$u_{0,A}$ , %	$u_{0,B}$ , %	$u_{0C}$ , %	$U_0$ , % при $k=2$
Количество теплоты	100–5000	0,2 ÷ 4,0 ( $n=10$ )	0,4 ÷ 1,5	0,5 ÷ 4,3	1,0 ÷ 8,6

Поскольку основной задачей разработки данного СО является возможность оценки метрологических характеристик СИ, в текущей работе не рассматривались стандартные реакции, требующие сложной пробоподготовки и предназначенные для комплексной оценки качества выполнения методик микрокалориметрических измерений. Но в качестве перспективных для таких исследований были отмечены реакции солей бария с дибензо-18-краун-6 и хлорида кальция с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Из рассмотрения также были исключены реакции нейтрализации, т. к. они могут быть подвержены влиянию растворенного  $\text{CO}_2$ , а вещества для проведения таких реакций могут быть коррозионно активны в отношении некоторых материалов конструкции калориметров.

В связи с доступностью материалов высокой чистоты отечественного производства, простотой приготовления и обработки данных для исследований и разработки СО теплоты растворения была выбрана стандартная реакция разведения растворов 1-пропанола в воде. Применение растворов разных концентраций позволит оценить метрологические характеристики СИ во всем заявленном диапазоне измерений.

В качестве материалов-кандидатов СО были выбраны коммерческие продукты СО состава пропанола-1. Их характеристики приведены в табл. 2.

Для подготовки образцов заданной концентрации из исходных была разработана и применена процедура, включающая оценку неопределенности определения концентрации получаемых растворов в соответствии с Руководством ЕВРАХИМ/СИТАК CG 4.

Для предварительных экспериментальных исследований растворы готовили гравиметрическим методом без последующего контроля другими методами. Чистый пропанол (СО состава пропанола-1 СОП 0023–03) подготавливали в соответствии с инструкцией по обращению и применению, приведенной в паспорте СО, охлаждали в течение не менее 1 часа при температуре  $(2 \pm 6)^\circ\text{C}$ . Для

приготовления раствора с массовой долей 2% брали 2 г пропанола и добавляли 98 г деионизированной воды, полученной на бидистилляторе УПВА-5–1 («Ливам», Россия), входящем в состав ГЭТ 133-2012. Для взвешивания навесок применяли весы Sartorius ME235S.

## Результаты и обсуждение

### Определение целевой неопределенности

Принцип действия ИКТ подробно описан в литературе [2]. Принципиальная схема калориметра изображена на рис. 2.

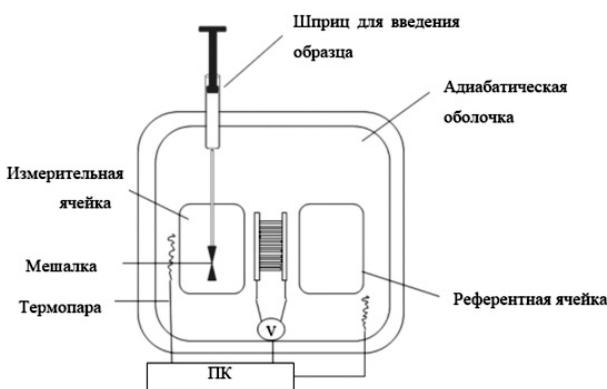


Рис. 2. Принципиальная схема изотермического калориметра титрования [2]

Fig. 2. Schematic diagram of an isothermal titration calorimeter [2]

Типичный изотермический калориметр титрования состоит из двух ячеек: измерительной и референтной. Система регулирования контролирует температуру ячеек таким образом, чтобы разница температур между ячейками была близка к нулю. При подаче образца в измерительную ячейку протекающий в ней химический процесс сопровождается выделением или поглощением тепла, которое вызывает изменение температуры в измерительной ячейке. Принцип действия таких калориметров основан на измерении термоэлектродвижущей

Таблица 2. Характеристики применяемых исходных веществ

Table 2. Characteristics of the starting materials

Наименование стандартного образца	Аттестованная характеристика	Значение аттестованной характеристики
СО состава раствора пропанола1 ГСО 11383–2019*	Массовая концентрация пропанола1	$(4,00 \pm 0,04) \text{ г/дм}^3$
СО состава пропанола-1 СОП 0023–03	Массовая доля пропанола-1	$(99,9 \pm 0,1)\%$

\* ГСО 11383–2019 Стандартный образец состава раствора пропанола-1 // ФИФ ОЕИ: официальный сайт.  
URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/812255>

силы, возникающей в термобатарее при прохождении через нее теплового потока от измерительной ячейки к массивному металлическому калориметрическому блоку калориметра.

Несмотря на схожий принцип действия, в конструкции различных моделей рабочих микрокалориметров имеются некоторые отличия: принцип компенсации мощности, материал, форма и объем ячеек калориметра, конструкция устройства для подачи образца и мешалки. Эти отличия существенно влияют на технические и метрологические характеристики микрокалориметров,

но при этом в официальных материалах производителей показатели точности измерений тепловых эффектов реакций не приведены.

Поэтому с целью оценки целевой неопределенности СО проведен анализ литературных источников, содержащих результаты измерений с применением современных микрокалориметров и информацию об оцененной стандартной неопределенности (табл. 3), межлабораторном стандартном отклонении из результатов межлабораторных экспериментов (табл. 4) и стандартном отклонении повторяемости (табл. 5).

Таблица 3. Неопределенность измерений теплового эффекта реакции с применением микрокалориметров согласно опубликованным данным

Table 3. The measurement uncertainty of the reaction heat of using microcalorimeters according to published data

Тепловой эффект реакции, $\Delta H$ , кДж/моль	Стандартная неопределенность измерений теплового эффекта реакции, $u(\Delta H)$ , кДж/моль*	Относительная стандартная неопределенность измерений теплового эффекта реакции, $u_0(\Delta H)$ , %*	Источник
-26,6	1,1	4,1	[22]
8,8÷43,0	0,9**	4,9**	[23]
0,5÷46,6	0,3**	4,4**	[24]
-8,8***	1,3	14,3	[17]
46,5***	2,3	5,0	[25]
27,2***	0,5	2,0	[16]

Примечания:

\* – пересчет значения неопределенности, приведенного в источнике, в другую форму выражения осуществлялся в соответствии с уравнениями:

$$u_0(X) = \frac{u(X)}{\bar{X}} \quad (1) \quad U = k \cdot u_c \quad (2)$$

\*\* – значение получено как среднее из приведенных результатов.

\*\*\* – значение пересчитано из ккал/моль в кДж/моль путем умножения на коэффициент 4,1868.

Таблица 4. Межлабораторное стандартное отклонение измерений теплового эффекта реакции с применением микрокалориметров согласно опубликованным данным

Table 4. Interlaboratory standard deviation of measurements of the reaction heat using microcalorimeters according to published data

Тепловой эффект реакции, $\Delta H$ , кДж/моль	Количество результатов участников	СКО, кДж/моль	Относительное СКО, %	Источник
-43,5	14	10,5	24	[10]
-17,5	12	0,4	2,3	[14]
15,0	12	0,4	2,6	
-9,26	7	0,7	7,5	[13]
-8,53	6	0,35	4,1	

Таблица 5. Стандартное отклонение повторяемости измерений теплового эффекта реакции с применением микрокалориметров согласно опубликованным данным  
 Table 5. Standard deviation of the measurement repeatability of the reaction heat using microcalorimeters according to published data

Тепловой эффект реакции, $\Delta H$ , кДж/моль	СКО, кДж/моль	Относительное СКО, %	Источник
-28,8÷-32,9*	0,3	0,8	[26]
-27,5	1,1	4,0	[27]
-20,4	0,7	3,4	
55	1	2	[18]
-9,07	0,05	0,6	
-17,4	0,2	1	
-50,7*	1,7	3,5	[9]
-46,0	1,2	2,6	[8]
-1,540	0,01	0,7	[15]
-0,604	0,01	1,8	
-0,196	0,01	2,8	
-59,5	3,3	5,5	[28]
-17,5*	0,4	2,1	[14]
15,0*	0,2	1,1	

\* – значение пересчитано из ккал/моль в кДж/моль путем умножения на коэффициент 4,1868.

В публикации Kantonen S. A. [16] предполагается, что для измерений теплового эффекта реакции достижи-ма неопределенность около 2%, но при этом наблюда-ется существенный разброс оценок неопределенности вплоть до 20% в зависимости от условий эксперимента и метода обработки данных.

Принимая во внимание более распространенные оценки неопределенности в других публикациях [17, 22–25] и типичное внутрилабораторное стандартное

отклонение в 1–2%, было принято решение принять как ориентировочную относительную стандартную неопре-деленность измерений тепловых эффектов реакций 4,5%, а целевую неопределенность стандартных образ-цов с учетом требуемого соотношения показателей точ-ностей средства поверки к поверяемому СИ «1:3» уста-новить на уровне 1,5%.

Установленные метрологические и технические тре-бования к разрабатываемым СО приведены в табл. 6, 7.

Таблица 6. Наименование аттестуемой характеристики, интервал допускаемых аттестованных значений и допускаемые значения расширенной неопределенности СО  
 Table 6. The name of the certified characteristic, the range of permissible certified values, and the permissible values of the expanded uncertainty of RMs

Индекс стандартного образца в наборе	Интервал допускаемых аттестованных значений интегральной теплоты разведе-ния, $\Delta H_m^0$ , кДж/моль*	Допускаемое значение относительной расширенной неопределенности ( $U$ )** при коэффициенте охвата $k=2$ , %
ИТР-ВНИИМ-2	-0,190÷-0,210	3,0
ИТР-ВНИИМ-5	-0,600÷-0,640	3,0
ИТР-ВНИИМ-10	-1,530÷-1,560	3,0

Таблица 7. Технические характеристики исходных материалов  
Table 7. Specifications of starting materials

Индекс СО в наборе	Исходное вещество	Нормативные документы, которым должны соответствовать исходные вещества
ИТР-ВНИИМ-2 ИТР-ВНИИМ-5 ИТР-ВНИИМ-10	СО состава пропанола-1 СОП 0023–03	ТУ 2631-031-56278322-2008

### Выбор методов и средств исследования однородности и стабильности

В соответствии с п. 7.5.1 ISO Guide 35 метод, применяемый при исследовании однородности, должен обладать хорошей повторяемостью, т. е. должно выполняться неравенство:

$$\frac{S_r}{\sqrt{n}} \leq \frac{u_{trg}}{3}, \quad (3)$$

где  $S_r$  – стандартное отклонение повторяемости метода, %;

$n$  – количество опытов;

$u_{trg}$  – целевая неопределенность СО, %.

Исходя из анализа стандартных отклонений повторяемости в оптимальных условиях можно считать достижимым  $s_r = 1\%$ , следовательно, неравенство (3) выполняется при  $n \geq 4$ .

Данное предположение было экспериментально проверено с применением микрокалориметра-компаратора NanoITC SV в серии экспериментов по измерению теплового эффекта реакции хлорида кальция и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Полученное среднее значение составило  $-17,58$  кДж/моль, а СКО составило  $0,05$  кДж/моль ( $0,3\%$ ).

При выборе метода исследования стабильности учитывали его повторяемость согласно неравенству (3), а также стабильность измерительной системы, т. к. исследования стабильности занимают продолжительное время. Стабильность измерительной системы считалась достаточной при выполнении неравенства:

$$\frac{|X_{t1} - X_{t0}|}{\bar{X}} \cdot 100\% \leq \frac{u_{trg}}{3}, \quad (4)$$

где  $X_{t1}$ ,  $X_{t0}$  – результаты измерений в моменты времени  $t_1$ ,  $t_0$  соответственно;

$\bar{X}$  – среднее результатов измерений.

Поскольку исследования стабильности планируется проводить в соответствии с классическим подходом на протяжении 6 месяцев, аналогичный срок был выбран для оценки стабильности измерительной системы.

Стабильность измерительной системы была экспериментально проверена для микрокалориметра-компаратора NanoITC SV в эксперименте по измерению теплового эффекта реакции хлорида кальция и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Полученное отклонение  $|X_{t1} - X_{t0}|$  составило  $0,07$  кДж/моль ( $0,4\%$ ).

На основании проведенных исследований сделан вывод о допустимости применения микрокалориметра-компаратора NanoITC SV для исследований однородности и стабильности СО.

### Опробование метода характеристики СО

Характеризация СО осуществляется методом прямых измерений с применением эталонного микрокалориметра МКТ из состава ГЭТ 133-2012.

Опробование метода было проведено путем измерения интегральной теплоты разведения  $2\%$  раствора пропанола-1 ( $n=2$ ). Полученное значение интегральной теплоты разведения составило  $0,200$  кДж/моль. Оцененная на основании характеристик эталонного микрокалориметра МКТ расширенная неопределенность составила  $1,4\%$ , что удовлетворяет требованиям к целевой неопределенности СО при условии подтвержденных однородности и стабильности.

Полученные результаты были валидированы путем сравнительного анализа результатов измерений, полученных на эталонном калориметре МКТ из состава ГЭТ 133-2012 с литературными данными [6, 15], полученными на прецизионных калориметрических установках.

Результаты CIQ(UP) (Португалия) приведены в соответствии с [15]. Указанная на рис. 3 неопределенность представлена двумя стандартными отклонениями.

Результаты Lund University (Швеция) вычислены в соответствии с уравнением, приведенным в [6]. Указанная на рис. 3 неопределенность представлена двумя стандартными отклонениями среднего.

Сопоставление значения интегральной теплоты разведения, определенного в ходе исследований материала-кандидата СО, с литературными данными позволяет сделать вывод, что полученные результаты хорошо

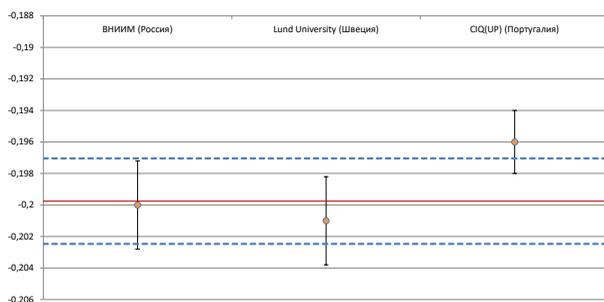


Рис. 3. Сравнительный анализ результатов измерений интегральной теплоты разведения 2% раствора пропанола-1

Fig. 3. Comparative analysis of the measurement results of the integral heat of dilution of a 2% solution of propanol-1

согласуются между собой, а прямой метод измерений с использованием эталонного микрокалориметра МКТ применим для характеристики СО.

### Заключение

В области измерений тепловых эффектов реакций с применением изотермических микрокалориметров титрования была отмечена несогласованность результатов, полученных на различных моделях СИ, и их несоответствие литературным данным. С целью совершенствования метрологического обеспечения в данной области была начата разработка сертифицированных стандартных образцов с аттестованным значением количества интегральной теплоты разведения с установленной метрологической прослеживаемостью. В ходе работы была осуществлена подготовка и разработан план проекта, выбраны исходные материалы, оценена целевая неопределенность значения количества теплоты разведения и установлены требования к стандартному образцу. Для выполнения этих требований были выбраны методы исследования однородности и стабильности, а также предложен и опробован прямой метод характеристики СО, обеспечивающий прослеживаемость к государственному первичному специальному эталону единицы количества теплоты в области калориметрии растворения и реакций ГЭТ 133-2012. В перспективе для завершения разработки СО запланированы экспериментальные исследования по характеристике, оценке однородности и стабильности материала СО, обработка полученных результатов и оценка неопределенности аттестованного значения.

Теоретическая значимость полученных результатов заключается в выработке основных подходов

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sarge S. M., Höhne G. W. H., Hemminger W. *Calorimetry: fundamentals, instrumentation and applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. 280 p. <https://doi.org/10.1002/9783527649365>

обеспечения прослеживаемости и единства измерений в области изотермической калориметрии титрования с применением стандартных образцов в качестве средства передачи единицы и эталонного микрокалориметра для их характеристики.

Практическая значимость полученных результатов исследования напрямую связана с разработкой и применением стандартных образцов (СО), предназначенных для поверки и калибровки средств измерений, и контроля точности аттестованных и стандартизованных методик. Их внедрение позволит повысить точность и достоверность результатов измерений, получаемых на СИ – изотермических калориметрах титрования.

**Благодарности:** Исследование выполнено в рамках совершенствования государственного первичного специального эталона единицы количества теплоты в области калориметрии растворения и реакций ГЭТ 133-2012. Измерения были выполнены на оборудовании ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева».

**Acknowledgments:** The study was carried out as part of the improvement of the State primary special standard of the unit of heat in the field of dissolution calorimetry and reactions GET 133-2012. The measurements were performed on the equipment of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology.

**Конфликт интересов:** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Материал статьи подготовлен на основе доклада, представленного на V Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях» (Екатеринбург, 13–16 сентября 2022 г.). Переводная версия статьи на английском языке планируется к публикации в книге Sobina E. et al. (eds.). *Reference Materials in Measurement and Technology*. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

**Conflict of interest:** The author declare no conflict of interest. The material of the article was prepared on the basis of the report presented at the V International Scientific Conference «Reference Materials in Measurement and Technology» (Yekaterinburg, September 13–16, 2022). A translated version of the article in English is planned for publication in the book Sobina E. et al. (eds.). *Reference Materials in Measurement and Technology*. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

2. *Kabiri M., Unsworth L.* Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies // *Biomacromolecules*. 2014. Vol. 15. P. 3463–3473. <https://doi.org/10.1021/bm5004515>
3. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry / R. J. Falconer [et al.] // *Journal of Molecular Recognition*. 2010. Vol. 23, № 5. P. 395–413. <https://doi.org/10.1002/jmr.1025>
4. *Falconer R. J., Collins B. M.* Survey of the year 2009: applications of isothermal titration Calorimetry // *Journal of Molecular Recognition*. 2011. Vol. 24, № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1002/jmr.1073>
5. *Prozeller D., Morsbach S., Landfester K.* Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle–protein interactions // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11, № 41. P. 19265–19273. <https://doi.org/10.1039/c9nr05790k>
6. *Wadso I., Goldberg R. N.* Standards in isothermal microcalorimetry // *Pure and Applied Chemistry*. 2001. Vol. 73, № 10. P. 1625–1639. <https://doi.org/10.1351/pac200173101625>
7. The Ca<sup>2+</sup>–EDTA chelation as standard reaction to validate Isothermal Titration Calorimeter measurements (ITC) / C. Rafols [et al.] // *Talanta*. 2016. Vol. 154. P. 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.075>
8. Titration calorimetry standards and the precision of isothermal titration calorimetry data / L. Baranauskiene [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. Vol. 10, № 6. P. 2752–2762. <https://doi.org/10.3390/ijms10062752>
9. Repeatability, precision, and accuracy of the enthalpies and Gibbs energies of a protein–ligand binding reaction measured by isothermal titration calorimetry / V. Paketyrytė [et al.] // *European Biophysics Journal*. 2019. Vol. 48, № 11. P. 139–152. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1341-z>
10. *Dean J. A.* Lange’s handbook of chemistry. New York, USA: McGraw-Hill, 1999.
11. *Christensen J. J., Hansen L. D., Izatt R. M.* Handbook of Proton Ionizations Heats. New York, USA: WileyInterscience, Hoboken, 1976.
12. The ABRF-MIRG’02 study: assembly state, thermodynamic, and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction / D. G. Myszkka [et al.] // *Journal of Biomolecular Techniques*. 2003. Vol. 14, № 4. P. 247–269.
13. Calibration of nanowatt isothermal titration calorimeters with overflow reaction vessels / N. A. Demarse [et al.] // *Analytical Biochemistry*. 2011. Vol. 41, № 7. P. 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.06.014>
14. A multi-laboratory benchmark study of isothermal titration calorimetry (ITC) using Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to EDTA / A. Velazquez-Campoy [et al.] // *European Biophysics Journal*. 2021. Vol. 50, № 3–4. P. 429–451. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01523-7>
15. Chemical calibration of isothermal titration calorimeters: An evaluation of the dilution of propan-1-ol into water as a test reaction using different calorimeters, concentrations, and temperatures / R. Adao [et al.] // *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2012. Vol. 52. P. 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.12.018>
16. *Kantonen S. A., Henriksen N. M., Gilson M. K.* Evaluation and minimization of uncertainty in ITC binding measurements: Heat error, concentration error, saturation, and stoichiometry // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. Vol. 1861, № 2. P. 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.002>
17. Bayesian analysis of isothermal titration calorimetry for binding thermodynamics / T. H. Nguyen [et al.] // *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, № 9. P. 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203224>
18. *Hansen L. D., Quinn C.* Obtaining precise and accurate results by ITC // *European Biophysics Journal*. 2019. Vol. 48, № 8. P. 825–835. <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01399-8>
19. *Tellinghuisen J., Chodera J. D.* Systematic errors in isothermal titration calorimetry: Concentrations and baselines // *Analytical Biochemistry*. 2011. Vol. 414, № 2. P. 297–299. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.024>
20. Usually overlooked problems related with measurements of high-heat effects using power compensation isothermal titration calorimetry / Ž. Medoš [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2021. Vol. 145. P. 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09663-2>
21. *Wadsö I.* Needs for standards in isothermal microcalorimetry // *Thermochimica Acta*. 2000. Vol. 347, № 1–2. P. 73–77. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(99\)00418-9](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(99)00418-9)
22. *Darnell A., Sikkly L., Porosk P.* Uncertainty of small enthalpy effects measured by isothermal calorimetric titration // *Journal of Chemical Metrology*. 2021. Vol. 15, № 1. P. 25–37. <https://doi.org/10.25135/jcm.57.21.03.1994>
23. *Gherrou A., Buschmann H.-J., Schollmeyer E.* Complex formation of crown ethers and cryptands with Ba<sup>2+</sup> in the biphasic system chloroform/water studied by titration calorimetry // *Thermochimica Acta*. 2005. Vol. 425, № 1–2. P. 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00369-1)
24. *Buschmann H. J., Mutihac R. C., Schollmeyer E.* Complex formation of 18-crown-6 with metal cations and ammonium ions in dioxane–water mixtures // *Thermochimica Acta*. 2008. Vol. 472, № 1–2. P. 17–19. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.03.010>
25. *Boyce S. E., Tellinghuisen J., Chodera J. D.* Avoiding accuracy-limiting pitfalls in the study of protein–ligand interactions with isothermal titration Calorimetry // Preprint submitted to *Analytical Biochemistry*. 2015. <https://doi.org/10.1101/023796>
26. *Turnbull W. B., Daranas A. H.* On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*. 2003. Vol. 125, № 48. P. 14859–14866. <https://doi.org/10.1021/ja036166s>
27. Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein–ligand thermodynamics / S. Grüner [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1840, № 9. P. 2843–2850. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.018>
28. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments / V. Linkuviene [et al.] // *Analytical Biochemistry*. 2016. Vol. 515. P. 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.005>

**REFERENCES**

1. Sarge S. M., Höhne G. W. H., Hemminger W. (2014) *Calorimetry: fundamentals, instrumentation and applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 280 p. <https://doi.org/10.1002/9783527649365>
2. Kabiri M., Unsworth L. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies. *Biomacromolecules*. 2014;15:3463–3473. <https://doi.org/10.1021/bm5004515>
3. Falconer R. J., Penkova A., Jelesarov I., Collins B. M. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition*. 2010;23(5):395–413. <https://doi.org/10.1002/jmr.1025>
4. Falconer R. J., Collins B. M. Survey of the year 2009: applications of isothermal titration Calorimetry. *Journal of Molecular Recognition*. 2011;24(1):1–16. <https://doi.org/10.1002/jmr.1073>
5. Prozeller D., Morsbach S., Landfester K. Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle–protein interactions. *Nanoscale*. 2019;11(41):19265–19273. <https://doi.org/10.1039/c9nr05790k>
6. Wadso I., Goldberg R. N. Standards in isothermal microcalorimetry. *Pure and Applied Chemistry*. 2001;73(10):1625–1639. <https://doi.org/10.1351/pac200173101625>
7. Rafols C. et al. The Ca<sup>2+</sup>–EDTA chelation as standard reaction to validate Isothermal Titration Calorimeter measurements (ITC). *Talanta*. 2016;154:354–359. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.075>
8. Barauskiene L., Petrikaitė V., Matulienė J., Matulis D. Titration calorimetry standards and the precision of isothermal titration calorimetry data. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(6):2752–2762. <https://doi.org/10.3390/ijms10062752>
9. Paketurytė V., Linkuvienė V., Krainer G., Chen W. Y., Matulis D. Repeatability, precision, and accuracy of the enthalpies and Gibbs energies of a protein–ligand binding reaction measured by isothermal titration calorimetry. *European Biophysics Journal*. 2019;48(11):139–152. <https://doi.org/10.1007/s00249–018–1341-z>
10. Dean J. A. *Lange's handbook of chemistry*. New York, USA: McGraw-Hill; 1999.
11. Christensen J. J., Hansen L. D., Izatt R. M. *Handbook of Proton Ionizations Heats*. New York, USA: WileyInterscience; 1976.
12. Myszk a D. G., Abdiche Y. N., Arisaka F., Byron O., Eisenstein E., Hensley P. The ABRF-MIRG'02 study: assembly state, thermodynamic, and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2003;14(4):247–269.
13. Demarse N. A., Quinn C. F., Eggett D. L., Russell D. J., Hansen L. D. et al. Calibration of nanowatt isothermal titration calorimeters with overflow reaction vessels. *Analytical Biochemistry*. 2011;417(2):247–255. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.06.014>
14. Velazquez-Campoy A., Claro B., Abian O., Höring J., Bourlon L., Claveria-Gimeno R. A multi-laboratory benchmark study of isothermal titration calorimetry (ITC) using Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to EDTA. *European Biophysics Journal*. 2021;50(3–4):429–451. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01523-7>
15. Adao R., Bai G. Y., Loh W., Bastos M. Chemical calibration of isothermal titration calorimeters: An evaluation of the dilution of propan-1-ol into water as a test reaction using different calorimeters, concentrations, and temperatures. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2012;52:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.12.018>
16. Kantonen S. A., Henriksen N. M., Gilson M. K. Evaluation and minimization of uncertainty in ITC binding measurements: Heat error, concentration error, saturation, and stoichiometry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017;1861(2):485–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.002>
17. Nguyen T. H., Rustenburg A. S., Krimmer S. G., Zhang H., Clark J. D., Novick P. A. et al. Bayesian analysis of isothermal titration calorimetry for binding thermodynamics. *PLOS ONE*. 2018;13(9):1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203224>
18. Hansen L. D., Quinn C. Obtaining precise and accurate results by ITC. *European Biophysics Journal*. 2019;48(8):825–835. <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01399-8>
19. Tellinghuisen J., Chodera J. D. Systematic errors in isothermal titration calorimetry: Concentrations and baselines. *Analytical Biochemistry*. 2011;414(2):297–299. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.024>
20. Medoš Ž., Čobanov I., Bešter-Rogač M., Šarac B. Usually overlooked problems related with measurements of high-heat effects using power compensation isothermal titration calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2021;145:87–96. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09663-2>
21. Wadsö I. Needs for standards in isothermal microcalorimetry. *Thermochimica Acta*. 2000;347(1–2):73–77. [https://doi.org/10.1016/S0040–6031\(99\)00418-9](https://doi.org/10.1016/S0040–6031(99)00418-9)
22. Darnell A., Sikkly L., Porosk P. Uncertainty of small enthalpy effects measured by isothermal calorimetric titration. *Journal of Chemical Metrology*. 2021;15(1):25–37. <https://doi.org/10.25135/jcm.57.21.03.1994>
23. Gherrou A., Buschmann H.-J., Schollmeyer E. Complex formation of crown ethers and cryptands with Ba<sup>2+</sup> in the biphasic system chloroform/water studied by titration calorimetry. *Thermochimica Acta*. 2005;425(1–2):1–5. [https://doi.org/10.1016/S0040–6031\(03\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0040–6031(03)00369-1)
24. Buschmann H. J., Muthiac R. C., Schollmeyer E. Complex formation of 18-crown-6 with metal cations and ammonium ions in dioxane–water mixtures. *Thermochimica Acta*. 2008;472(1–2):17–19. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.03.010>
25. Boyce S. E., Tellinghuisen J., Chodera J. D. Avoiding accuracy-limiting pitfalls in the study of protein–ligand interactions with isothermal titration Calorimetry. Preprint submitted to *Analytical Biochemistry*. 2015. <https://doi.org/10.1101/023796>
26. Turnbull W. B., Daranas A. H. On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(48):14859–14866. <https://doi.org/10.1021/ja036166s>

27. Grüner S., Neeb M., Barandun L. J., Sielaff F., Hohn Ch. Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein–ligand thermodynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1840(9):2843–2850. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.018>
28. Linkuviene V., Krainer G., Chen W. Y., Matulis D. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments. *Analytical Biochemistry*. 2016;515:61–64. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.005>

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

ISO Guide 35:2017(E) Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Fourth edition. 2017. 114 p

Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC. 3rd ed. 2012. Available at: [https://www.citac.cc/QUAM2012\\_P1.pdf](https://www.citac.cc/QUAM2012_P1.pdf).

#### **ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Мишина Карина Андреевна** – инженер лаборатории эталонов и научных исследований в области калориметрии горения и особо чистых органических веществ для метрологических целей ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»  
190005, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19  
e-mail: k. a.mishina@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0401-5405>

#### **INFORMATION ABOUT THE AUTHORS**

**Karina A. Mishina** – Engineer of the Laboratory for Measurement Standards and Scientific Research in the field of Combustion Calorimetry and High-Purity Organic Substances for Metrological Purposes, D. I. Mendeleev Institute for Metrology (VNIIM)  
19 Moskovsky ave., St. Petersburg, 190005, Russia  
e-mail: k. a.mishina@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0401-5405>

