

Micro-Oxymax 測定原理

はじめに: Micro-Oxymaxは微生物や微小動物の呼吸代謝ガスを連続的に測定する装置(図-1)です。測定した呼吸ガスを%濃度で記録し、その消費量・産出量を比率や積算値として表示しモニターします。

測定の対象は極微量の呼吸量でしかも極僅かな濃度変動を捉えるので、測定メカニズムは極めて精密で最大感度も $0.2\mu\text{l}/\text{時}$ と高感度を誇ります。

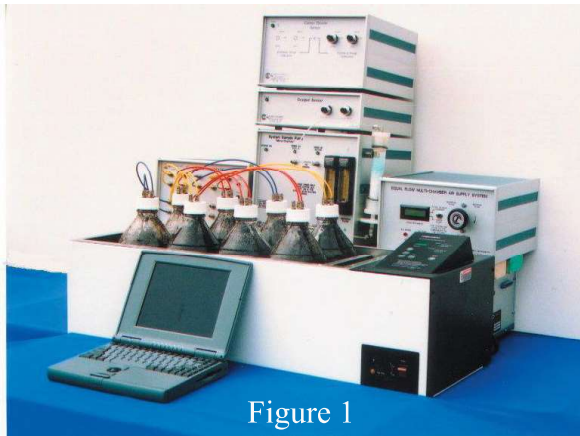


Figure 1

当然この僅かな濃度変化を正確に測ることができるガスセンサーの精度や性能も重要な要因となりますが、Micro-Oxymaxが高感度なのは”Closed Loop”と呼ばれる測定メソッドから生まれたものです。さらに測定目的に特化したAdd-Onオプションを組み込むことで機能はさらに強化されます。ここではこの”Closed Loop”測定法の作動原理、Micro-Oxymaxに導入されるガスセンサーの種類と機能について説明します。

”Closed Loop”法の作動原理は欧米、日本において特許を取得しています—4947339(US)、0372429(EUR)、2117492(JPN)。ここでは数式を引用しながら測定手順を判り易く解説します。

”Closed Loop”測定法は端的に述べると、測定チャンバーの上部空間(head space)の気体を分離抽出し、十分にミックスしてガスセンサー部に通し、最後にサンプルチャンバーに戻す工程をシステム化したものです。

特許には%濃度の算出方法も含まれています。ガスセンサーからは随時測定値は得られますが、その値は測定チャンバーの濃度を直接反映したものではありません。センサーが捉える値から逆算し測定するチャンバー内のガス濃度に対応する値に換算します。それにはチャンバー内の気体の容量が必要ですが実際に秤量するのは不可能なので、Micro-Oxymaxでは圧センサーを使って加圧した既知容量の圧と未知容量の圧とを比較し、ボイルの法則($P_1V_1=P_2V_2$)から容量を算出します。

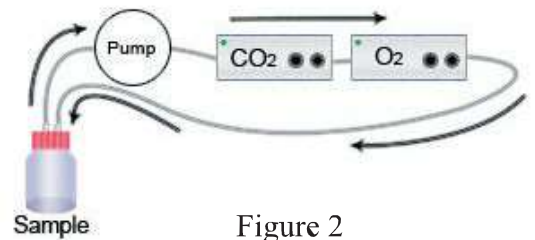
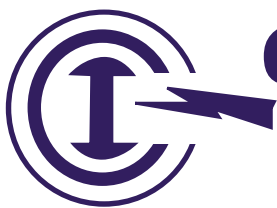


Figure 2



Columbus Instruments

950 N. Hague Ave.; Columbus, OH 43204 U.S.A.

Phone: (614) 276-0861 Fax: (614) 276-0529

Email: sales@colinst.com Web: www.respirometer.com

実際の測定工程は大気圧の計測、センサー部の容積、測定チャンバーの容量、リファレンスエアガスの濃度、排気エアガスの濃度、サンプルヘッドガスの濃度、センサーのドリフトの校正など10段階の工程を1サイクルとして最初に行います。

各工程に入る前に、まずシステム内のどのコンポーネントがどのような働きをしているかを説明します。

リファレンスチャンバー：容積が正確に1ℓのステンレス製の容器で二つの機能があります。

- 1)容積が判っているので、付加した圧力からセンサー及びサンプルチャンバーの上部空間部の容積を算出する。
- 2)測定サイクル終了毎にセンサーのドリフトを校正するのに用いる既知濃度のリファレンスエアガスを保持する。

A/Dコンバータ：ガスセンサーと圧センサーから受けるアナログ信号をデジタル信号に変換する。

これは、1)PCへのデジタル入力用、2)デジタル信号でエアの開閉を制御するバルブ用に必要です。

マニフォールド及びバルブ1～8：各測定工程でエアフローに使用。

圧センサー：圧力レギュレータに係る圧の計測。始動時にはセンサーとチャンバーの容積を算出するのに利用し、ボイルの法則に則って圧力から容積を算定します。

圧力レギュレータ：圧力センサー内のガス圧を一定に保つ。

ポンプ：エアを吸排気するポンプで、起動時には静かな振動音が出ます。

本体システムとは別にサンプルチャンバーと圧力センサーが付属します。センサーの作動原理は後で触れますが、図ではサンプルチャンバーが“システムサンプルポンプ”に直接つながっています。

通常は多検体用のシステムなので、システムサンプルポンプとサンプルチャンバーとの間にマルチプレクサーが付き、いわゆる“拡張インターフェースExpansion Interface”として働きます。この部分はマニフォールドとバルブから成り、各サンプルチャンバーからシステムサンプルポンプ及びガスセンサーへの切り替えを担います。言い換えれば、A/Dコンバータとコントローラからの信号を拡張インターフェースによってバルブが開閉し指定したサンプルガスを測定工程に誘導します。

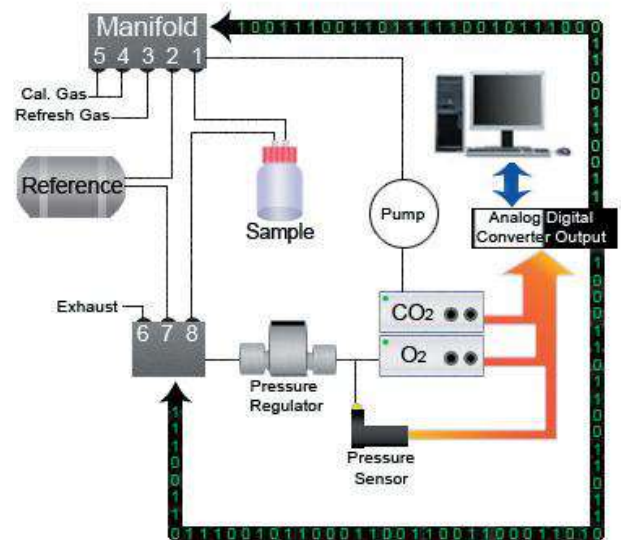


Figure 3

Step 1

初動測定サイクルの10ステップ:

Step1: 最初の工程は部屋の大気圧の計測です。リファレンスチャンバー、サンプルチャンバー、ガスセンサー部を開放し外気と同化させます。システム内の圧力センサーで計測し記録します。

システム内の圧は部屋の大気圧と平衡になります(図4)。システム容量の大半を占めるサンプルチャンバーとリファレンスチャンバーは外気に対して解放状態となります。

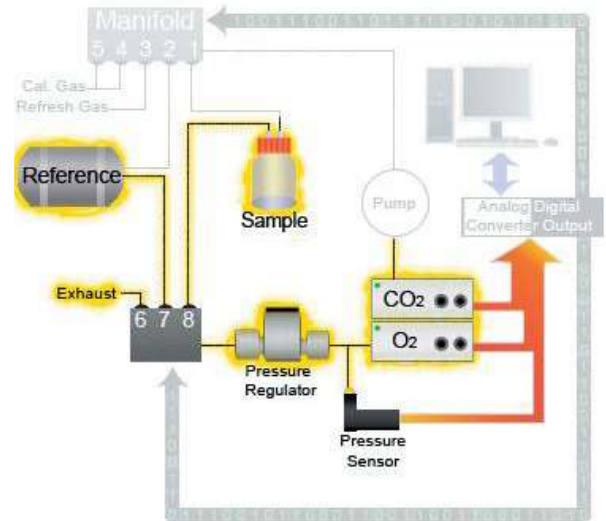


Figure 4

Step 2

Step2: ガスセンサー部の容量を測定します。サンプル測定する際にこの容量分を控除しますのでここでの測定値は重要です。ガスアナライザーが示す値はサンプルチャンバーと配管チューブに加えセンサー部自体も含めた全容量に対する濃度です。濃度は容積%で表わされますので、サンプルガス濃度を正確に求めるにはセンサー部と配管部の容積分を控除する必要があります。

センサー部の容積は3工程で測ります。まず外気でセンサー部を大気圧から+50mmHg加圧します(図-5)。所定の圧力に達するとバルブが閉じエア(別称リフレッシュエア)の流れが止まります。この時、通常は内部圧の変動によって圧力値が僅かに上がりますが、安定したら値は記録されます。これは二番目の測定値なのでP2と表記します。

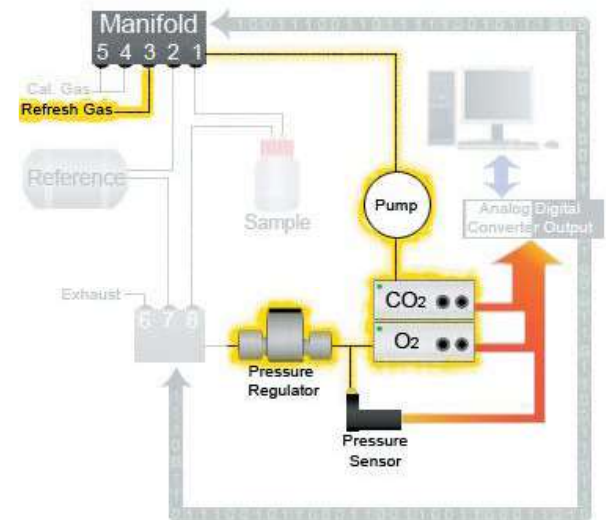


Figure 5

次に加圧したセンサー部をリファレンスチャンバー(図-6)と平衡圧にします。圧が安定するとこの値が記録されます。通常は大気圧より若干高い数値を示します。

僅かなサンプル容量とは違って100mlの大気圧下にあるリファレンスチャンバー(Step1で)と平衡圧にすると初期値である大気圧+50mmHgの値が大きく減少します。この圧力値をP3とします。

サンプル容量算出の最後のStepはセンサー部の容積の算定です。例えば、A)加圧されたセンサー部の圧力値(P2)から大気圧を控除した値と、B)これに対応するリファレンスチャンバーとの平衡圧値(P3)から大気圧を控除した値とは比例関係にあるので、ボイルの法則に従って既知のリファレンスチャンバーの容積からセンサー部の容積が算出できます。

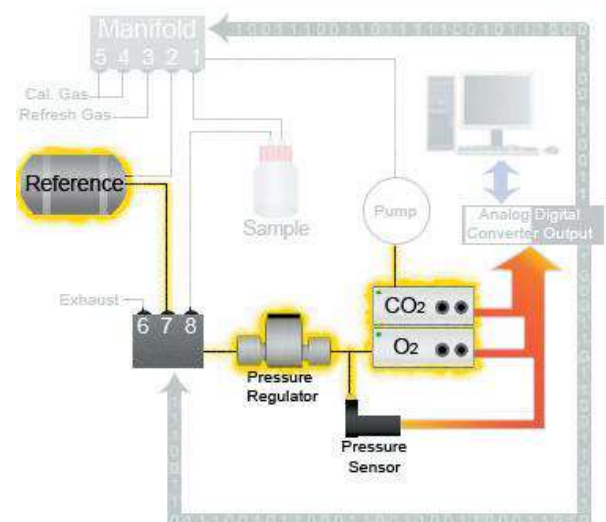


Figure 6

この工程では計測した二つの圧力値から大気圧を控除しましたが、これはリファレンスチャンバーが既に大気圧で平衡になっているからです。容積1の圧力値を求めるには、容積2に同容積のエアを充填し得られた圧力の値から算出できます。容積2は1ℓと決まっているので、容積が変わる前後の圧力が判れば容積1の容量が算出できることになります。この応用で大気圧と平衡のリファレンスチャンバーとセンサー部との平衡化から得られた圧力値からセンサー部の容積が算出できます。

ここで用いる実際の数式は、ボイルの法則に則って：

$$V_s = \frac{V_R}{\left(\frac{(P_2 - P_A)}{(P_3 - P_A)}\right) - 1}$$

...where:

- V_s = Sensor Volume
- V_R = Reference Chamber Volume
- P_A = Barometric Pressure
- 1 = a remainder from the cancellation of units

Step3: サンプルチャンバーの容積を求めます。基本的には Step1と2の繰り返しです。まずリファレンスチャンバー、サンプルチャンバー、センサー部を大気圧と平衡圧に保ちます。すべてのバルブを閉じ、次いでシステム全体を再度外気と平衡にします。次にサンプルチャンバーとセンサー部とを大気圧より約50mmHg高く加圧します(図-7)。ここでの圧力値を計測しP4とします。記録したらサンプルチャンバーと連結し(図-8)この圧力を計測してP5とします。

これでサンプルチャンバーの容積が求まりますが、この計算はセンサー部の容積の場合とは少し異なります。違いは既知容積としてリファレンスチャンバーとセンサー部の容積を使う点です(Step3ではリファレンスチャンバーとセンサー部を加圧しますが、Step2ではセンサー部だけを加圧しました)。再びボイルの法則から次の数式を導入します：

$$V_T = \frac{V_R + V_S}{\left(\frac{(P_4 - P_A)}{(P_5 - P_A)}\right) - 1}$$

...where:

- V_T = Sample Chamber Volume
- V_S = Sensor Volume
- V_R = Reference Chamber Volume
- P_A = Barometric Pressure
- 1 = a remainder from the cancellation of units

Step 3

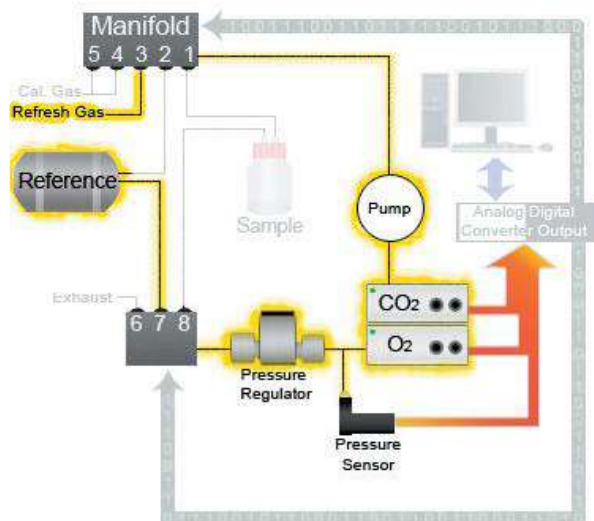


Figure 7

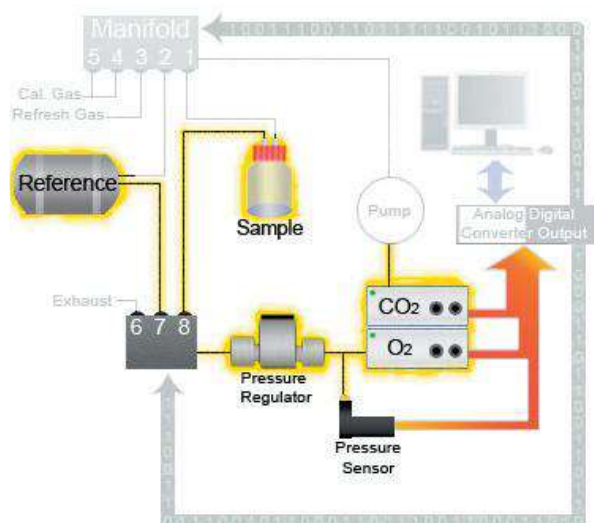


Figure 8

Step4: 容積測定の際にはSTP(標準圧力・標準温度)に換算して容積を算出しサンプルチャンバーに外気を充填します(図-9)。必要に応じて外気の代わりに混合ガスを用いる場合もあります。

混合ガスはガスミキサー(Pegas 4000MF等)や市販の混合ガスボンベを使います。

マルチチャンバーシステムではサンプルチャンバーを個々に換気するので他のチャンバーと混ざることはありません。この時リファレンスチャンバーにも同じエア(外気、または使用する混合ガス)を充填します。

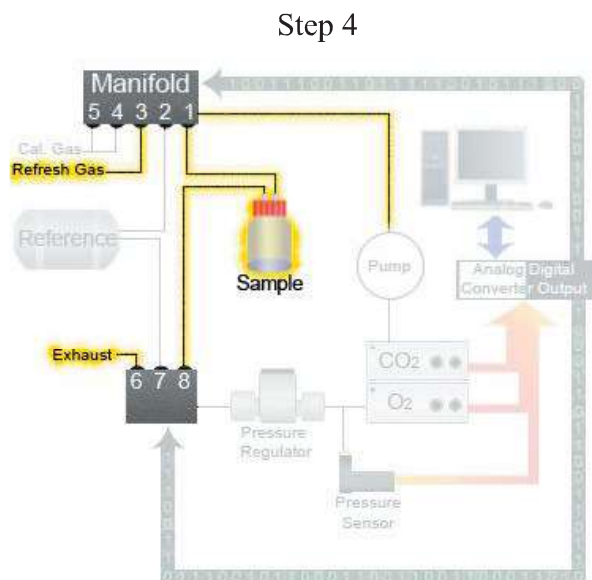


Figure 9

Step5: 次にリファレンスチャンバーのガス濃度を測ります(図-10)。この時点(Step4以降は)ではリファレンスチャンバー内は未だ外気、または使用混合ガスが充填されており、この濃度を測ることになります。

リファレンスチャンバー内のガス濃度を測るのはガスセンサーのドリフト(Step10で後述します)を考慮に入れる為です。

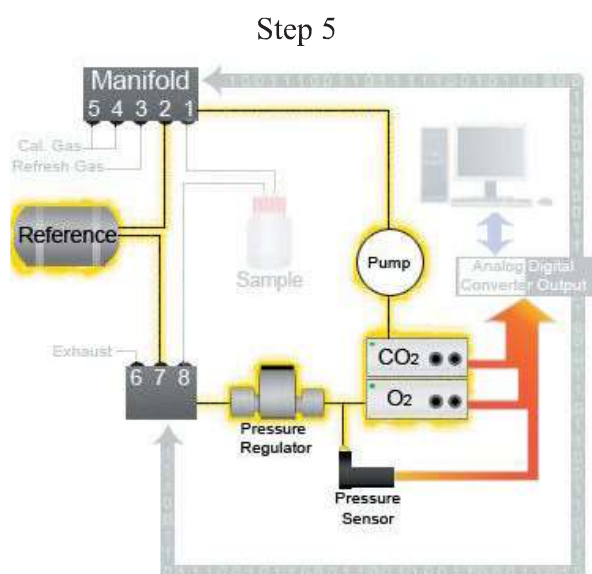


Figure 10

Step6: パージするガス濃度を測定します(図-11)。

これは大事な工程で、各サンプル測定ではセンサー内部を外気でパージすることで、前の測定でセンサー内部に残ったサンプルの残余ガスを除去します。

次のサンプルを測る際にはセンサー内の僅かな量のガスがサンプルチャンバーと混りますので、予めガスセンサーでパージするガスの濃度を測っておく必要があります。

サンプルを測定した後にこの値分を差し引きます。

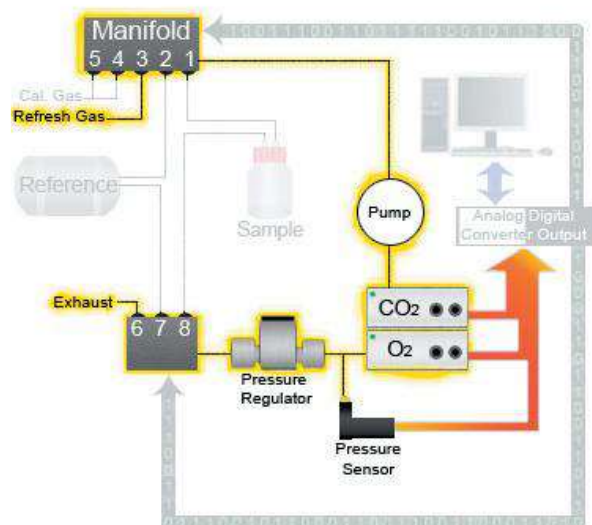


Figure 11

Step7: いよいよサンプルの測定です。

サンプルチャンバーのヘッドスペース内の検体ガスをセンサー部へ循環させサンプルチャンバーに戻します。
システムではこの工程を3分で実行し、ガスセンサーで濃度を読み取ります(図-12)。

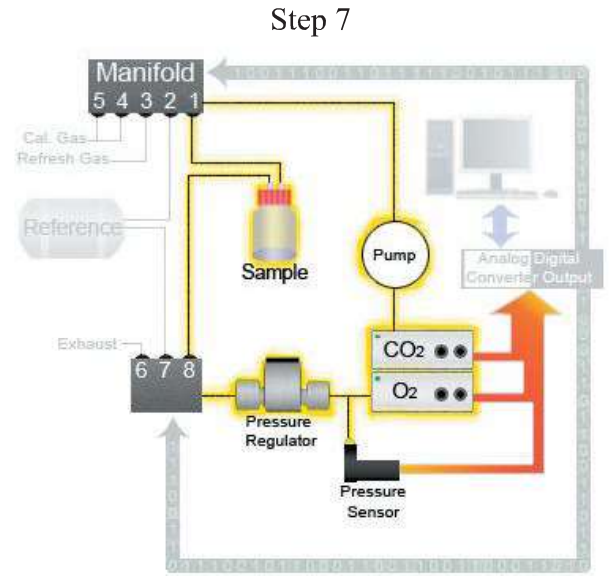


Figure 12
Step 8

Step8: ヘッドスペースの最初の検体ガスを測定したら、センサー内の残余検体ガスをパージし取り除きます(図-13)。
この工程は、次のサンプルチャンバーのヘッドスペースにこの残余ガスが混入して検体ガスの測定に影響を与えるのを避ける為にも重要な工程です。

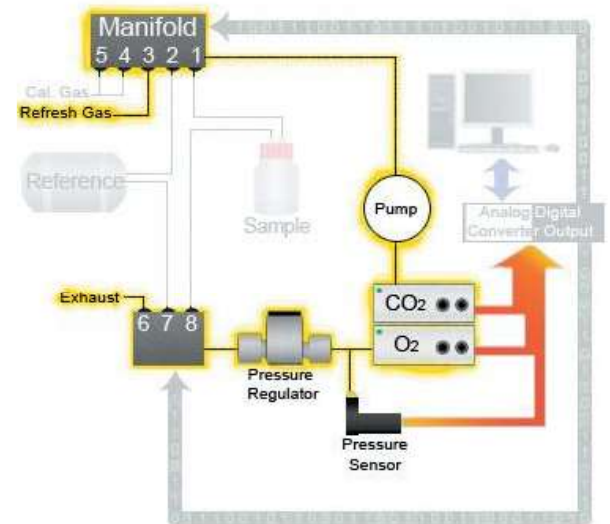


Figure 13

Step9: センサー部のパージが終了したら次のサンプルガスの測定に移ります。

Step7、Step8の工程を反復して全てのサンプルガスを測定します。ここで記録されるデータの一行目は各検体ガスの初期濃度を表しますが、次の測定値が記録されるまで変化は表示しません。

初期設定で“Auto Interval”に設定しておくで、直ちに最初のサンプルガスの測定に戻り、再度Step7、Step8を繰り返します。

“Auto Interval”を選択しなければInterval時間を入力します。入力した時間に達すると最初のサンプルチャンバーから測定が始まります。

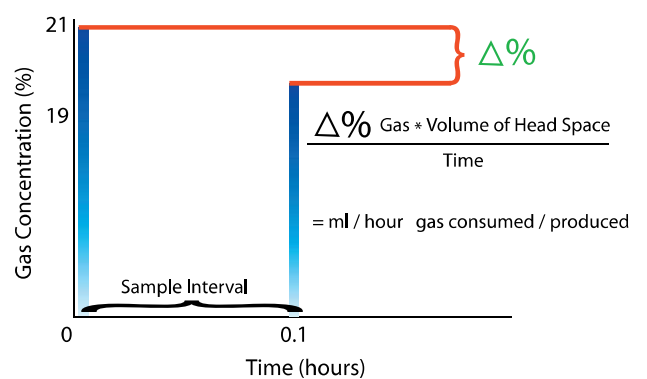


Figure 14

二検体の測定濃度が判ればその濃度差にサンプルチャンバーのヘッドスペース容積を乗じ、測定インターバル時間で割った値を算出します(図-14)。

Step10: 最後にリファレンスチャンバーのガス濃度を再度測定します。ここでの測定値とStep5で記録した値とを比べ、両者に差がある場合はそれをセンサーのドリフトと見なします。長期間の測定では、センサーがキャリブレーション時の設定値からズレてきます。測定の途中ではセンサーの再キャリブレーションはできないので、各測定サイクルの終了時毎に既知サンプルのガス濃度を測りこのズレをドリフトと見なして記録し補正します。各サイクル間のセンサードリフトは僅かなものなので確認は困難ですが、測定が数日に亘る場合は測定終了時にはこの差がはっきりと現れます。

センサーの種類によってドリフトの影響は違います。電気化学 (Electrochemical) センサーは影響され易いタイプですが、赤外線やパラマグネチックセンサーはドリフトの影響が極めて少なくほぼ無視できます。

次に測定原理の特性について述べます。

ガス(気体)センサーのテクノロジー: MicroOxymaxは測定目的に対応する様々なタイプのガスセンサーを採用します。ここでは常磁性(Paramagnetism)、電気化学燃料電池(Electrochemical Fuel Cell)、非分散型赤外線検出(Non-Dispersive Infrared detection)方式のガスセンサーについてその仕組みを簡単に説明します。

常磁性(図-16): これは酸素の物理的な特性を利用したものです。酸素は磁場内では特異な反応を示し被写体と相互作用を呈します。”ダンベルdumbbell”から成るパラマグネチック(常磁性)酸素センサーを極細線から生ずる磁場に配置してサンプルガスを200ml/分以下の低速で流すと、ガスがダンベルを通過するにつれて酸素の磁性特性によりダンベルを押し上げ回転させます。その作用でダンベルを保持する細線に捻じれが生じます。このダンベルの回転は酸素の濃度に比例し、濃度が高ければ回転は強くなります。ダンベルが回転するにつれて細線は捻じれるので、そこに配置したミラーに光を当てればその反射光からダンベルの回転を知ることができます。

回転するダンベルが元に戻ろうとする作用で細線には僅かな電流が流れます。酸素濃度が高ければダンベルが元の位置に戻るのに要する電流は大きくなります。この電流がセンサーが示す酸素濃度のシグナルとなります。

Step 10

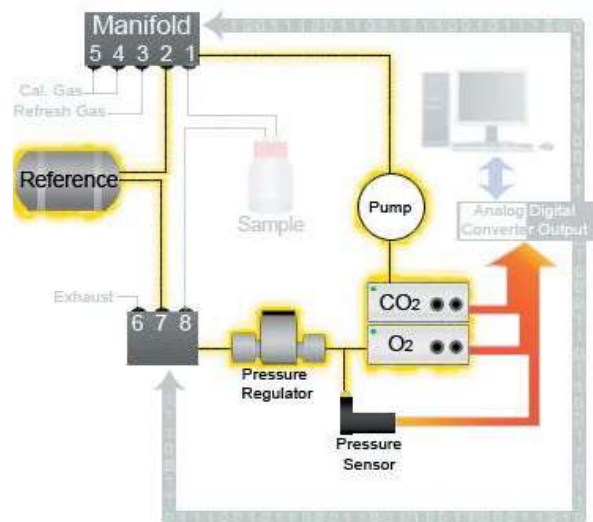


Figure 15

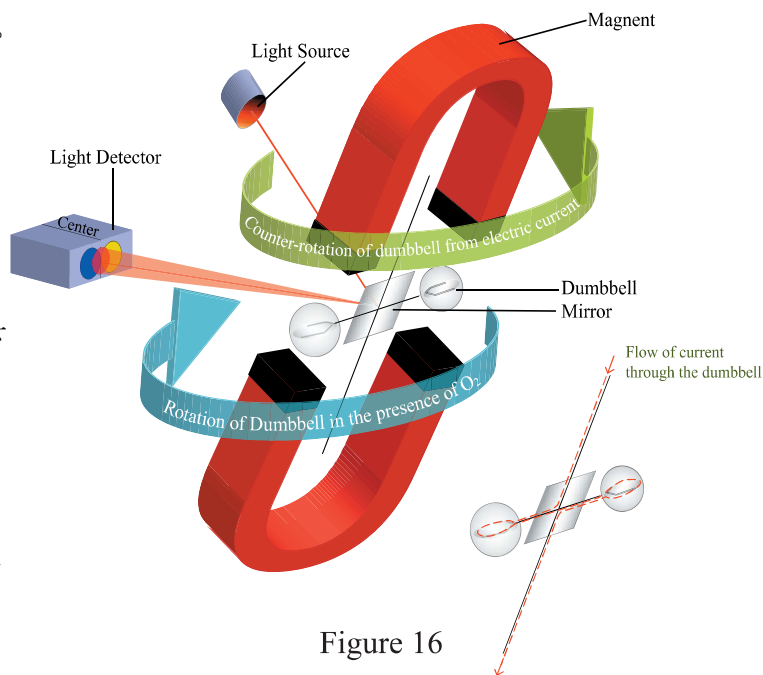


Figure 16

電気化学的燃料電池(図-17): 名前が示す様にこのセンサーはバッテリー(電池)なので、使用期間が限定されます。

電池は徐々に減衰するので、これがドリフト(各サイクルの終了時に控除する)となります。このセルタイプのセンサーは酸素、水素、硫化水素、酸化窒素、一酸化炭素(2000ppm)、及び二酸化硫黄の検出に使用します。

電気化学セルはサンプル中に現存する各気体が電気的に反応することで機能します。対象ガス(酸素とすると)がセルに流れ込むと反応し、サンプル中の酸素濃度に比例する電流が生じます。電気化学的燃料電池は測定中に対象ガスを消費します。従って繰り返し測定する際は、消費分を勘案して算定する必要があります。

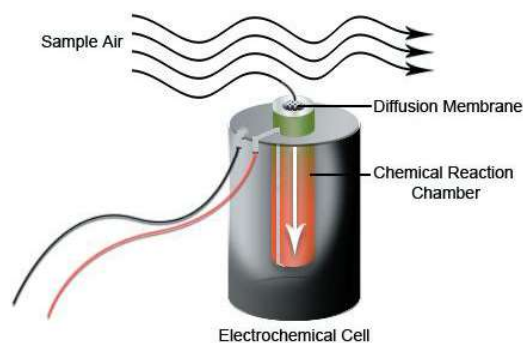


Figure 17

非分散型赤外線検出(図-18): この測定法はいわゆる分光法です。

特定の波長の赤外線をサンプルガスに照射し吸収される光量を記録するものです。二酸化炭素、メタン、一酸化炭素(10%)の測定に用います。これらのガスは極めて特異的な波長幅の赤外線しか吸収しません。各対象センサーはそれに対応する波長の赤外線(IR)を放射し、サンプルガスを透過する光量を検出器が記録します。この値の逆数がサンプルガスの濃度に比例します。

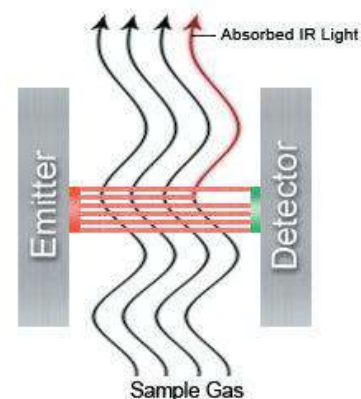


Figure 18

オプションアクセサリ: 以上がMicro-Oxymaxの作動原理の説明です。次はオプションアクセサリを組み込んでシステムをカスタマイズする例を紹介します。Micro-Oxymaxは土壌、水溶液、汚泥、堆肥高分子、嫌気性培養など様々な対象の呼吸ガス測定が可能です。

ただし対象検体の性質によっては前処理が必要な場合があります。

開回路オプション(Open Circuit Option):

測定対象が活性化した汚泥や堆肥、小動物など呼吸ガスの能動性が高い場合は開回路オプション(図-19)を使ってエアの流量を高め検体の生育・熟成を保持します。

閉回路(Closed Loop)システムではサンプルチャンバーを換気する前に対象物を呼吸難にさせてしまう恐れがありますので、開回路オプションを用いてサンプルチャンバーへ外気を常時給気します。



ヘッドスペース部の気体はサンプルチャンバーの流れに乗ってガスアナライザーに運ばれ測定されます。

ここではガスの消費量/産出量の比を逆算しますので、チャンバーに流れる気体の流量を知っておく必要があります。この為、装置内部に正確な流量コントローラを配置し、特別設計のマニフォールドが均等にかつ正確に外気を各チャンバーへ等流量給排します。この様な機能を持つシステムを間接熱量測定器(Indirect Calorimeter)と呼び、高活性微生物に限らず爬虫類、魚類、両生類、小動物などの動物類が測定対象となります。

凝縮エアードライヤー：溶液や多湿なサンプルが測定対象となる場合は、エアードライヤーを使ってサンプルを凝縮するとMicroOxmaxの精度が著しく向上します。

凝縮ドライヤーはサンプルとシステムサンプルポンプの上の標準ガスドライヤーとの間に配置します。これでサンプルガス中の水蒸気を凝縮させサンプルガスを約4°C(室温に依る)まで冷却します。この効果には二つの利点があります：

- 1)凝縮された水蒸気は凝結水としてサンプルチャンバーに戻るのを防ぐ、
- 2)ドライヤーに充填した乾燥剤の使用期間が延びる。サンプルが水溶液の場合はこのオプションは必ず必要です。水の蒸発速度が高いとサンプルチャンバーのヘッドスペースの容積が増え、その結果ガスの消費量/産出量の比の算定が不正確になります(測定の初めにサンプルチャンバー容量を測り、これを演算の基準としている為)。

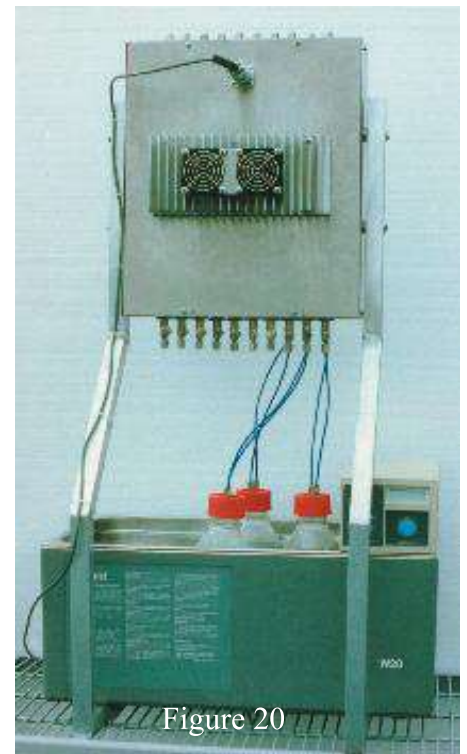


Figure 20

嫌気的なセットアップ：対象が嫌気サンプルの場合は各サンプルに2個のサンプルチャンバーを使います(図-21)。サンプルチャンバーの密栓はセプタム(隔壁)タイプを用います。シリンジでセプタムを穿刺しチューブをつなぎ、一方向チェックバルブをセットします。サンプルガスはゆっくりとサンプルチャンバーから流れ出てチェックバルブを通過して測定チャンバーと呼ぶ二番目のチャンバーに流れ込みます。嫌気サンプルから流出したガスはサンプルチャンバーに入り、これを測定するわけです。

この設定には三つの利点があります：

- 1)サンプルの準備が簡単でシリンジで測定系に導入できる。チューブを接続する際に外気がサンプルチャンバーに混入するのを避ける。
- 2)チェックバルブを使うので外部から気体が入る恐れが無い。
- 3)チャンバーの換気を高価なガスボンベから導入せずに外気からできる。

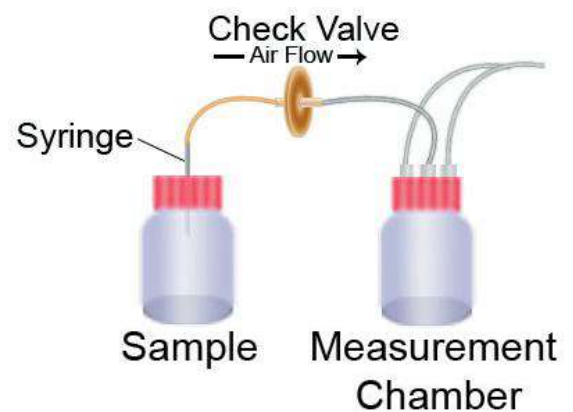


Figure 21

Closed Looped測定手法を要約すると：外気をリファレンスチャンバー及びサンプルチャンバーに導入しながら、各チャンバー内のサンプルガスを循環させてガスセンサー、圧センサー、圧力レギュレータに通して測定し、元のチャンバーに戻す。サンプルガスの消費量/産出量の比は、センサーからのシグナルを受けてガスの循環を制御するマイクロプロセッサーによって算出する。センサーのドリフトによる誤差は各チャンバーの測定時に補正する。同様にリファレンスチャンバーとサンプルチャンバー、及びセンサー部の容積を算定する際もこの補正が有効に働き精度を高める。

この様にMicro-Oxymaxは信頼性の高い測定原理に基づいたシステムです。

必要なガスセンサーを組み込み、さらに目的に合うオプションを導入することにより様々な対象の呼吸ガス測定が可能となります。