

多项式拟合法设定辐照灭菌剂量的研究

龚 频 汤晓斌 陈 达

(南京航空航天大学 核科学与工程系 南京 210016)

摘要 受传统方法精确度的限制,生产实践中辐照灭菌剂量的设定值往往超过产品的实际需要。多余的辐照剂量会对产品造成不必要的辐照损伤,同时也降低了辐照工厂的产能。本文通过理论研究证明,任一给定抗性分布的微生物种群存在一条非线性的“灭菌剂量曲线”。对于具有标准抗性分布(Standard distribution of resistances, SDR)的微生物种群,采用5种常用函数拟合其灭菌剂量曲线的结果表明,5次多项式函数的拟合程度最好。与传统使用线性函数拟合的方法相比,基于5次多项式函数拟合的灭菌剂量设定方法可以将所设定的灭菌剂量与理论值的偏差范围从-9.8% - 123.1%缩小至-7.7% - 1.9%。此方法可以在保证产品灭菌合格的基础上有效降低多余的辐照剂量。

关键词 多项式拟合, 辐照灭菌, 标准抗性分布, 灭菌剂量设定

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2014.hjs.37.110202

随着辐射加工产业的不断发展,辐照灭菌因其常温加工、无残留等优点成为一种常规的灭菌方式。使产品中菌落总数或指定菌种的数量达到无菌保证水平所需要的最低辐照剂量称为灭菌剂量。灭菌剂量设定得过高会对产品造成不必要的损伤及造成辐照工厂产能的浪费,设定得过低则会导致产品灭菌失败。因此提高产品辐照灭菌剂量设定的准确性十分重要。目前医疗器械类产品一般采用国际标准ISO11137-2:2013(医疗保健产品-辐照-第二部分:设定灭菌剂量)中的三种方法设定产品初始污染菌的灭菌剂量^[1]。这三种方法所依据的原理造成其设定的灭菌剂量在理论上要高于产品实际需要的灭菌剂量。而对于非医疗器械类产品,一般根据式(1)通过线性拟合实验数据得到菌落总数或指定菌种的 D_{10} 值(使某菌种数量下降为原来的10%所需要的辐照剂量),进而计算出所需的灭菌剂量^[2-12]。然而使用该方法设定灭菌剂量时存在一个问题,即产品微生物种群是由不同 D_{10} 值的菌种组成,其综合“ D_{10} 值”在不同的辐照剂量下并不是一个常数。因此通过线性拟合的“ D_{10} 值”来计算其灭菌剂量将导致不可预料的偏差。实践中为保证此类产品灭菌合格,只有不断提高产品的灭菌剂量,造成如今许多产品的辐照剂量超过其实际需要。如何更加精确地设定产品的灭菌剂量,在保证产品灭菌合格的基础上降低多余的辐照剂量,是一个亟需解决的问题。

$$\lg N = \lg N_0 - \frac{1}{D_{10}} \times D \quad (1)$$

式中, N_0 为某微生物的初始含菌量; D 为辐照剂量; N 为辐照剂量 D 对应的剩余含菌量。

1 多项式拟合法的原理

1.1 微生物种群的灭菌剂量曲线

根据辐照灭菌的基本理论,初始含菌量为 N_0 的某种微生物,其辐照后的剩余含菌量 N 与辐照剂量 D 及该微生物 D_{10} 值的关系满足:

$$N = N_0 \times 10^{-\frac{D}{D_{10}}} \quad (2)$$

对于单一菌种来说,其 D_{10} 值为常数,辐照后的剩余含菌量 N 与辐照剂量 D 符合式(2)的规律。而对于微生物种群来说,由于微生物种群是由许多具有不同 D_{10} 值的菌种组成,随着辐照剂量的增加,微生物种群的综合“ D_{10} 值”会发生变化。因此微生物种群的剩余含菌量与辐照剂量的关系不能简单套用式(2)来描述。假设产品辐照前的菌落总数为 N_0 ;该微生物种群由 k 种不同辐照抗性的微生物组成; D_{10i} 为第 i ($i=1, 2, \dots, k$)种微生物的 D_{10} 值; p_i 为第 i 种微生物数量在菌落总数中的百分比。则根据式(2)可以得到辐照后的菌落总数 ΣN 与辐照剂量 D 的关系式为:

中央高校基本科研业务费青年科技创新基金(No.NS2014060)资助

第一作者:龚频,男,1980年出生,2002年毕业于南京大学,助教,研究领域为辐射加工与辐照灭菌

通讯作者:陈达, E-mail: dachen@nuaa.edu.cn

收稿日期:2014-07-16, 修回日期:2014-09-02

$$\Sigma N = N_0 \times \sum_{i=1}^k (p_i \times 10^{-\frac{D}{D_{10i}}}) \quad (3)$$

用 DM (Decreased orders of Magnitude) 表示菌落总数下降的数量级, 则 DM 与辐照前菌落总数 N_0 及辐照后菌落总数 ΣN 的关系为:

$$DM = \lg \left(\frac{N_0}{\Sigma N} \right) \quad (4)$$

假设某产品要求灭菌后菌落总数从 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低至 $100 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 则根据式(4)可以得到 $DM=4$, 表示菌落总数下降 4 个数量级。 DM 值越大意味着菌落总数下降的程度越高, 因此 DM 值可以用来表示辐照灭菌的效果。由式(3)、(4)可得:

$$DM = -\lg \sum_{i=1}^k (p_i \times 10^{-\frac{D}{D_{10i}}}) \quad (5)$$

式中, DM 是以 D_{10i} 和 p_i 为参数; D 为自变量的函数。它必然存在一个反函数, 如式(6)所示:

$$D=f(DM) \quad (6)$$

式中, D 即产品微生物种群的灭菌剂量, 它是以 D_{10i} 和 p_i 为参数; DM 为自变量的函数。这里将 $f(DM)$ 定义为微生物种群的“灭菌剂量曲线”。

对于任一给定抗性分布的微生物种群, 其 D_{10i} 和 p_i 为一组常数, 此时存在一条非线性的灭菌剂量曲线 $f(DM)$ 。如果 $f(DM)$ 的表达式已知, 当参数 D_{10i} 和 p_i 确定时, 就可以根据 DM 值计算出对应的灭菌剂量 D 。然而 $f(DM)$ 的表达式很难由式(5)直接推导出。为了解决这个问题, 可以用另一个表达式已知的函数 $g(DM)$ 来拟合灭菌剂量曲线。在拟合程度足够高的情况下可以使用 $g(DM)$ 来代替 $f(DM)$ 计算所需的灭菌剂量。

表 2 具有标准抗性分布的微生物种群在不同辐照剂量下的 DM 值
Table 2 DM value of micropopulation having SDR under different radiation doses.

D / kGy	DM	D / kGy	DM	D / kGy	DM	D / kGy	DM
0.0	0.00	12.0	5.32	24.0	8.77	36.0	11.91
1.0	0.80	13.0	5.63	25.0	9.04	37.0	12.17
2.0	1.47	14.0	5.94	26.0	9.30	38.0	12.42
3.0	2.02	15.0	6.24	27.0	9.57	39.0	12.68
4.0	2.49	16.0	6.53	28.0	9.84	40.0	12.93
5.0	2.91	17.0	6.82	29.0	10.10	41.0	13.18
6.0	3.30	18.0	7.11	30.0	10.36	42.0	13.44
7.0	3.67	19.0	7.39	31.0	10.62	43.0	13.69
8.0	4.02	20.0	7.67	32.0	10.88	44.0	13.94
9.0	4.36	21.0	7.95	33.0	11.14	45.0	14.19
10.0	4.69	22.0	8.22	34.0	11.40	—	—
11.0	5.01	23.0	8.50	35.0	11.66	—	—

1.2 5 种常用函数拟合灭菌剂量曲线结果及分析

为了使研究具有一般性意义, 我们采用国际标准 ISO11137-2:2013 中的标准抗性分布 (Standard distribution of resistances, SDR) 来计算微生物种群的灭菌剂量曲线数据(表 1)。SDR 是一组人为选定的不同 D_{10} 值菌群在微生物种群中的存在概率分布。它被国际标准所采用, 用于在全世界范围内设定医疗器械类产品的灭菌剂量, 其有效性经过大量理论和实践的检验。

表 1 ISO11137-2:2013 中方法一所采用的标准抗性分布
Table 1 SDR used in method 1 of ISO11137-2:2013.

微生物的 D_{10} 值 D_{10} value of microbe / kGy	概率 Probability / %
1.0	65.487
1.5	22.493
2.0	6.302
2.5	3.179
2.8	1.213
3.1	0.786
3.4	0.350
3.7	0.111
4.0	0.072
4.2	0.007

假设某产品的微生物种群符合 SDR, 则根据式(5)可计算出其辐照剂量 D 为 0–45.0 kGy 时, 对应的菌落总数下降的数量级 DM 值, 如表 2 所示。表 2 中辐照剂量 D 最大值选择为 45.0 kGy, 这是因为该剂量下的 DM 值开始超过 14。 DM 为 14 意味着可以将菌落总数水平从 10^8 降低至 10^{-6} 。一般产品辐照前菌落总数极少能达到 10^8 , 而 10^{-6} 为产品的无菌级别, 实践中产品含菌量不需要降至更低水平。

由表 2，以 DM 为横坐标， D 为纵坐标作图可以得到具有 SDR 的微生物种群理论上的“灭菌剂量曲线”。这是一条通过(0,0)点略微下凸的递增曲线。根据灭菌剂量曲线的形状特点，选择 5 种常用的函

数，使用 Origin 软件对表 2 中的数据进行拟合，拟合出的各曲线如图 1 所示。表 3 为 5 种函数拟合的统计结果。表 4 是根据 5 种拟合函数计算出的灭菌剂量与理论值的偏差。

表 3 5 种函数拟合的统计结果
Table 3 Statistical fitting results of 5 functions.

函数类型 Function type	公式 Formula	参数 Parameters	拟合的参数值 Parameters value after Fitting	参数值的标准偏差 Standard error of values	调整后的 R 方 Adjusted R-Square
直线 Line	$y=ax$	a	2.902 65	0.041 53	0.964 66
幂函数 Power	$y=ax^b$	a	1.283 96	0.015 92	0.999 7
		b	1.344 48	0.005 13	—
多项式 Polynomial	$y=A_0+A_1x+A_2x^2+A_3x^3$	A_0	-0.243 02	0.07	0.999 95
		A_1	1.240 23	0.037 72	—
		A_2	0.233 13	0.005 83	—
		A_3	-0.006 82	$2.607 82 \times 10^{-4}$	—
多项式 Polynomial	$y=A_0+A_1x+A_2x^2+A_3x^3+A_4x^4+A_5x^5$	A_0	0.051 97	0.021 5	1
		A_1	0.776 68	0.028 87	—
		A_2	0.392 07	0.012 53	—
		A_3	-0.026 98	0.002 21	—
		A_4	0.001 02	$1.694 54 \times 10^{-4}$	—
		A_5	$-1.601 85 \times 10^{-5}$	$4.684 88 \times 10^{-6}$	—
指数函数 Exponential	$y=ab^x$	a	5.706 64	0.388 26	0.960 83
		b	1.164 05	0.006 75	—

表 4 5 种拟合函数计算出的灭菌剂量与理论值的偏差(%)
Table 4 Differences between sterilization dose calculated by 5 fitting functions and the theoretical value (%).

DM	拟合函数的公式 Formula of fitting functions				
	$y=ax$	$y=ax^b$	$y=A_0+A_1x+A_2x^2+A_3x^3$	$y=A_0+A_1x+A_2x^2+A_3x^3+A_4x^4+A_5x^5$	$y=ab^x$
1	123.1	0.0	-7.7	-7.7	407.7
2	93.3	10.0	3.3	0.0	156.7
3	67.3	7.7	3.8	1.9	73.1
4	45.0	3.8	0.0	-1.3	31.3
5	31.8	1.8	-0.9	0.0	10.9
6	22.5	0.7	-0.7	0.0	0.0
7	15.3	0.0	-0.6	0.0	-6.3
8	9.4	-0.9	-0.5	0.0	-9.4
9	4.8	-1.2	-0.4	0.0	-10.0
10	1.4	-0.7	0.3	0.0	-8.7
11	-1.8	-0.6	0.0	0.0	-6.8
12	-4.1	0.0	0.3	0.3	-2.8
13	-6.5	0.2	0.0	0.0	2.0
14	-8.1	0.9	-0.2	0.2	8.4
15	-9.8	1.7	-0.8	0.2	15.6

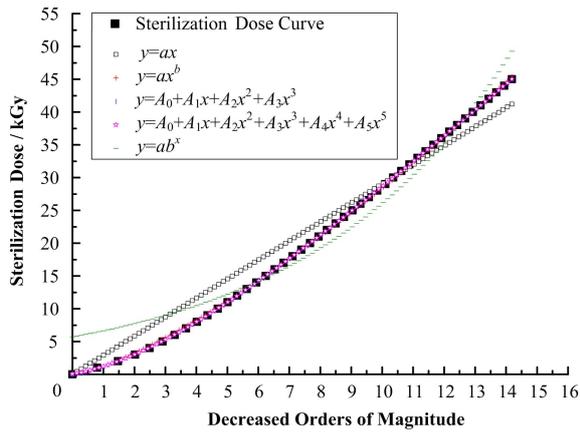


图 1 5 种函数的拟合曲线
Fig.1 Fitting curve of 5 functions.

从图 1 可以看出, 直线函数和指数函数与理论上微生物种群的灭菌剂量曲线的偏差相对较大。其拟合结果的 R^2 分别为 0.964 66 与 0.960 83 (R^2 越接近 1, 拟合程度越高)。因此这两种函数不适合用于拟合微生物种群的灭菌剂量曲线。值得注意的是, 由式(1)转换得到的 D 表达式的形式与直线函数 $y=ax$ 相同。因此目前非医疗器械类产品的微生物种群灭菌剂量设定方法其实是采用了直线函数对灭菌剂量曲线进行拟合。从表 4 可以看出, 这种方法设定的微生物种群灭菌剂量与理论值的偏差在-9.8%到 123.1%之间, 在 DM 值小于等于 3 时比理论值偏高 50%以上。由此可见, 采用传统方法通过线性拟

合微生物种群的“ D_{10} 值”来计算灭菌剂量, 会造成产品的灭菌剂量设定值大大超过产品的实际需要, 存在程度较高的过量辐照。

另外三种函数, 幂函数、3 次多项式和 5 次多项式都与灭菌剂量曲线比较接近, 从图 1 中不易分辨其优劣性。但从表 3 的统计结果显示, 3 次多项式和 5 次多项式的 R^2 比幂函数更接近 1。其中 5 次多项式的 R^2 为 1, 拟合程度最好。由表 4, 根据 5 次多项式拟合的曲线计算出的灭菌剂量, 与微生物种群灭菌剂量曲线的偏差最小。其偏差在-7.7%到 1.9%之间, 在 DM 值大于等于 5 时与理论值的偏差不超过 0.3%, 明显优于传统方法中通过线性函数的拟合曲线计算出的灭菌剂量。

2 多项式拟合法使用举例

下面举例说明在实践中如何使用多项式拟合法来设定微生物种群的灭菌剂量。例子中涉及到的辐照实验数据并非实测的实验数据, 而是采用 SDR, 根据式(3)计算得来。假设某产品辐照前菌落总数 $N_0=5.0 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 要求灭菌后菌落总数 $\Sigma N < 5\ 000 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此时灭菌剂量的设定过程如下。

首先, 选择 0-12 kGy, 以 2 kGy 为间隔对产品样品进行辐照, 并分别测定其菌落总数。实验结果如表 5 所示。其中 DM 值由式(4)计算得出。

表 5 不同剂量下的菌落总数检测结果

Table 5 Results of aerobic bacteria counts under different doses.

辐照剂量 Radiation dose / kGy	菌落总数 Aerobic bacteria counts / $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	DM
0	5.0×10^7	0
2	1.7×10^6	1.47
4	1.6×10^5	2.49
6	2.5×10^4	3.30
8	4.8×10^3	4.02
10	1.0×10^3	4.70
12	2.4×10^2	5.32

然后选择 5 次多项式函数 $y=A_0+A_1x+A_2x^2+A_3x^3+A_4x^4+A_5x^5$, 使用 Origin 软件拟合表 5 中的数据, 确定各参数, 得到式(7)。

$$D = -4.416\ 51 \times 10^{-5} + 1.407\ 16DM - 0.343\ 83DM^2 + 0.288\ 01DM^3 - 0.057\ 07DM^4 + 0.003\ 89DM^5 \quad (7)$$

最后根据产品菌落总数的灭菌要求, 由式(4)计算得 $DM=4.0$ 。将 DM 值代入式(7), 计算得灭菌剂量 $D=7.9 \text{ kGy}$ 。

在生产过程中, 如果该产品某个批次辐照前的菌检数据显示, 其菌落总数高于或者低于 $5.0 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 只要认为其微生物种群的抗性分布没有发生变化, 都可根据式(4)先计算出 DM 值, 然后根据式(7)计算出该批次产品所需要的灭菌剂量值。

使用多项式拟合法需要注意的是, 5 次多项式拟合时需要确定的未知数有 6 个, 因此辐照实验的剂量点不应少于 6 个 (0 除外)。另外最终的灭菌剂量计算所使用的 DM 值不应超过实验数据的范围。

如上述案例中最终计算灭菌剂量时所用的 *DM* 值不得超过 5.32。这是因为多项式函数外推的有效性还有待证实。为保证这一点，在设定灭菌剂量时，辐照实验选用的最高剂量应该足够大，保证该产品可用的 *DM* 值达到上限。

3 结语

理论研究和计算结果表明，任一给定抗性分布的微生物种群在理论上存在一条非线性的“灭菌剂量曲线”。在 5 种常用函数中 5 次多项式函数与微生物种群理论上的灭菌剂量曲线拟合程度最好。基于 5 次多项式函数拟合的微生物种群灭菌剂量设定方法与基于线性拟合的传统方法相比更加精确，可以在保证产品灭菌合格的基础上有效降低多余的辐照剂量，对于减少产品不必要的辐照损伤和提高辐照工厂的产能有一定的实用价值。

参考文献

- 1 Technical committee ISO/TC 198. ISO 11137-2 Sterilization of health care products-radiation-Part 2: establishing the sterilization dose[S]. Switzerland: ISO, 2013
- 2 刘超超. 辐照对鲜切蔬菜品质影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 17-27
LIU Chaochao. Studies of irradiation effect on quality of fresh-cut vegetables[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 17-27
- 3 徐远芳, 邓钢桥, 彭玲, 等. 辐照对食用槟榔的杀菌效果及品质的影响[J]. 核农学报, 2014, **28**(2): 240-244
XU Yuanfang, DENG Gangqiao, PENG Ling, *et al.* Effect of irradiation on sterilization and quality of edible areca nut[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, **28**(2): 240-244
- 4 董丹, 刘会平, 徐涛, 等. 辐照对花椒粉中微生物及抗氧化性的影响[J]. 中国调味品, 2013, **38**(6): 35-40
DONG Dan, LIU Huiping, XU Tao, *et al.* Effects of irradiation on microorganism and antioxidant activity of chinese prickly ash powder[J]. China Condiment, 2013, **38**(6): 35-40
- 5 朱佳廷, 冯敏, 杨萍, 等. 辐照对宠物食品鸡肉中致病微生物及贮藏效果的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, **40**(8): 252-254
ZHU Jiating, FENG Min, YANG Ping, *et al.* Effects of irradiation on pathogenic microorganisms and storage of pet food chicken[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, **40**(8): 252-254
- 6 贾倩. 电子束和 γ 射线辐照在素鸡保鲜中的比较研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012: 5-11
JIA Qian. Comparison effects of electron beam and gamma irradiation on preservation of steamed tofu rolls[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012: 5-11
- 7 邓钢桥, 邹朝晖, 彭玲, 等. 泡椒凤爪微生物污染来源及辐照杀菌效果的研究[J]. 激光生物学报, 2012, **21**(3): 209-213
DENG Gangqiao, ZOU Zhaohui, PENG Ling, *et al.* Microbial survey during preparation processing and irradiation sterilization effect of pickled chicken's feet[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2012, **21**(3): 209-213
- 8 史德芳, 周明, 杨德, 等. 香菇复合调味品辐照灭菌效果及其品质的影响[J]. 湖北农业科学, 2011, **50**(19): 4046-4048
SHI Defang, ZHOU Ming, YANG De, *et al.* Sterilization effect and quality impact of irradiation on compound condiment of *Lentinus edodes*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, **50**(19): 4046-4048
- 9 Mustapha M B, Bousselemi M, Jerbi T, *et al.* Gamma radiation effects on microbiological, physico-chemical and antioxidant properties of Tunisian millet (*Pennisetum Glaucum L.R.Br.*)[J]. Food Chemistry, 2014, **154**(1): 230-237
- 10 Kim H J, Ham J S, Lee J W, *et al.* Effects of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into sliced and pizza cheeses[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2010, **79**(6): 731-734
- 11 Aouidi F, Ayari S, Ferhi H, *et al.* Gamma irradiation of air-dried olive leaves: effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds[J]. Food Chemistry, 2011, **127**(3): 1105-1113
- 12 Kim K H, Kim M S, Kim H G, *et al.* Inactivation of contaminated fungi and antioxidant effects of peach (*Prunus persica* L. Batsch cv Dangeumdo) by 0.5-2 kGy gamma irradiation[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2010, **79**(4): 495-501

Study on setting the sterilization dose by polynomial fitting method

GONG Pin TANG Xiaobin CHEN Da

(Department of Nuclear Science and Engineering, Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing 210016, China)

Abstract Background: The setting of sterilization dose in practice is usually higher than the actual need of product due to the accuracy limit of traditional methods. Extra irradiation dose leads to unnecessary radiation damage to products and reduces the production capacity of irradiation plants. So it is important to find a more accurate method to set the sterilization dose for micropopulation. **Purpose:** This research is to find a new approach to set the sterilization dose more accurately for micropopulation of products. **Methods:** First of all, the relationship between the survival bacteria count and radiation dose through theoretical derivation is studied. Then, the data of sterilization dose curve of micropopulation is calculated according to the standard distribution of resistances (SDR). Finally, five kinds of commonly used fitting functions are applied to fit the sterilization dose curve. **Results:** The five cubed polynomial function is one of the best fitting methods to the sterilization dose curve. The sterilization dose setting method based on five cubed polynomial fitting reduces the deviation range from $-9.8\% - 123.1\%$ to $-7.7\% - 1.9\%$ between set sterilization dose and theoretical value, compared with the traditional method based on linear fitting. **Conclusion:** The method of polynomial fitting is more accurate that can reduce the extra radiation dose of products effectively when guarantee the quality of sterilization.

Key words Polynomial fitting, Radiation sterilization, Standard distribution of resistances (SDR), Sterilization dose setting

CLC TL99