

最大剂量斜率法设定菌落总数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 选用对数去除率(log-reduction, LR)坐标研究非医疗保健产品菌落总数的辐照灭菌剂量设定问题。以具有标准抗性分布(Standard distribution of resistances, SDR)的菌落总数为研究对象, 选择剂量范围从0-1至0-20 kGy, 剂量间隔从1至10 kGy的共56种实验剂量点选取方案, 按照传统方法拟合出每个实验方案下的菌落总数“ D_{10} 值”, 并计算出 LR 坐标下相应的灭菌剂量曲线。计算结果表明, 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌剂量的有效范围为 $LR \leq LR_{\max}$, 其中 $LR_{\max}$ 为增量剂量实验中最大剂量点 $D_{\max}$ 对应的 LR 值。在此有效范围内, 采用最大剂量斜率 $D_{\max}/LR_{\max}$ 设定的菌落总数灭菌剂量比传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的灭菌剂量更接近理论值。最大剂量斜率法与传统方法相比可以大大减少实验次数, 并且所设定的菌落总数灭菌剂量更加准确, 可以减少不必要的过量辐照, 是对传统方法的一大改进。

关键词 最大剂量斜率法, 菌落总数, 辐照灭菌, 灭菌剂量设定, 对数去除率坐标

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.020501

在辐照灭菌工艺中, 使产品微生物含量达到卫生标准所需要的最低辐照剂量称为产品的灭菌剂量。辐照灭菌的对象一般为产品上的菌落总数或某个特定菌种如大肠杆菌、霉菌、沙门氏菌等。医疗保健产品的灭菌要求杀灭产品上的所有微生物, 因此灭菌对象仅为产品的初始污染菌(菌落总数), 一般采用国际标准ISO11137-2中的方法设定其灭菌剂量^[1]。而非医疗保健产品的灭菌除了有菌落总数要求外, 往往还有某特定菌种数量要求(通常为致病菌)。例如GB30616-2014(食品安全国家标准-食品用香精)中规定, 乳化香精菌落总数应 ≤ 5000 CFU/mL, 同时大肠菌群应 ≤ 3.6 MPN/mL。无论是菌落总数还是某特定菌种, 非医疗保健产品灭菌剂量设定的传统方法均为线性拟合“ D_{10} 值”法^[2-15]。“ D_{10} 值”是令某种微生物数量下降为原来的10%所需要的辐照剂量。该传统方法首先使用一组增量剂量对产品样品进行辐照, 得到不同剂量 D 下菌落总数或某特定菌种的剩余含菌量 N , 然后通过线性拟合 $\lg N$ 和 D 得到菌落总数或某特定菌种的“ D_{10} 值”, 最后使用此“ D_{10} 值”根据灭菌要求计算出所需的灭菌剂量。由于该方法在非医疗保健产品灭菌剂量设定的实践中被长

期广泛地使用, 人们往往忽略了其使用存在的一个默认的前提条件, 就是菌落总数或某特定菌种在不同辐照剂量下应当有一个恒定的“ D_{10} 值”。对于某特定菌种, 同类微生物的辐照抗性趋于一致, 其“ D_{10} 值”可近似认为是一个常数。而菌落总数则是由许多具有不同 D_{10} 值的微生物按照一定比例混合而成, 具有一定的辐照抗性分布。考虑到辐照抗性分布的存在, 菌落总数的“ D_{10} 值”在不同辐照剂量下很可能不是一个常数。那么采用传统的线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数的灭菌剂量时, 增量剂量实验中不同的实验点选取方案很可能拟合出不同的“ D_{10} 值”。对于同一个产品, 根据不同的“ D_{10} 值”将计算出不同的灭菌剂量。这些灭菌剂量是否全部有效? 如果并非全部有效, 那么其有效范围是什么? 是否可以对传统方法进行一些改进以确保其有效性? 这些问题需要通过一定的研究予以解答。本文以医疗保健产品灭菌剂量设定的国际标准ISO11137-2: 2013中的标准抗性分布(Standard distribution of resistances, SDR)为研究对象, 选用对数去除率(log-reduction, LR)坐标研究传统线性拟合“ D_{10} 值”法的有效范围及其改进方法。

基金资助: 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7月出生, 2002年毕业于南京大学, 核物理与核技术专业, 助教, 从事辐照灭菌研究, E-mail: Gongpin@nuaa.edu.cn

通讯作者: 陈达, 教授, 博士生导师, 院士, E-mail: dachen@nuaa.edu.cn

收稿日期: 收稿 2014-10-28; 修回 2014-11-28

1 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌剂量的有效范围分析

1.1 研究对象

非医疗保健产品设定菌落总数灭菌剂量的传统方法为线性拟合“ D_{10} 值”法。该方法不考虑菌落总数实际上存在的抗性分布。为了研究考虑抗性分布情况下使用传统方法设定的灭菌剂量的有效范围,本文选择了一个理论上的抗性分布作为研究对象。由于非医疗保健产品抗性分布的研究几乎为空白,因此本文选用医疗保健产品灭菌剂量设定的国际标准 ISO11137-2: 2013 中的标准抗性分布(SDR)作为研究对象,如表 1 所示。选用 SDR 的目的仅是选取一个人们相对比较熟悉的抗性分布。如果将 SDR 更

换成其他的抗性分布,重复本文的研究过程可以发现本文的结论仍然成立。

1.2 研究方法

首先根据单个菌种辐照灭菌的理论公式推导出考虑抗性分布的菌落总数辐照灭菌的理论公式,计算出具有 SDR 的菌落总数在不同辐照剂量 D 下的剩余含菌量 N ,将此数据作为菌落总数灭菌剂量的理论值。然后模拟传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定灭菌剂量的实验过程,在上述(D, N)数据中根据实验方案选取部分实验点拟合出菌落总数的“ D_{10} 值”。最后将根据菌落总数“ D_{10} 值”设定的灭菌剂量与理论值进行比较,分析传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌剂量的有效范围。

表 1 ISO11137-2:2013 中的标准抗性分布
Table 1 Standard distribution of resistances (SDR) used in ISO11137-2:2013

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

本文选用一个新的坐标—对数去除率(log-reduction, LR)坐标研究非医疗保健产品菌落总数的辐照灭菌剂量设定问题。 LR 值可由公式(1)计算得到。

$$LR = \lg\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (1)$$

其中, N_0 为微生物的初始含菌量, N 为辐照后的剩余含菌量。 LR 的含义为微生物灭菌后的数量与灭菌前相比所下降的数量级。以往的灭菌剂量研究中,一般以辐照剂量 D 为 x 轴,微生物剩余含菌量 N 或其对数 $\lg N$ 为 y 轴绘制微生物生存曲线进行研究。同一种抗性分布的菌落总数随着初始含菌量 N_0 的变化将对应无数条微生物生存曲线。而本文所采用的新坐标— LR 坐标可以将无数条微生物生存曲线合并为一条“灭菌剂量曲线”。 LR 坐标即以 LR 为 x 轴,灭菌剂量 D 为 y 轴的坐标。在此坐标下绘制的微生物的“灭菌剂量曲线”不受微生物初始含菌量 N_0 变化的影响。同一种抗性分布的菌落总数在 LR 坐标下只反映为一条曲线,大大简化了研究过程。并且在实际的生产实践中,一般需要根据产品初始含菌量 N_0 及灭后菌数量 N 的要求来设定产品灭菌剂量 D ,相当于已知 LR 值来求 D 。因此以 LR 为 x

轴, D 为 y 轴的坐标更符合灭菌剂量设定的习惯。

1.3 具有 SDR 的菌落总数灭菌剂量理论值计算

根据微生物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} 值的关系满足公式(2)。

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

研究表明菌落总数是由许多具有不同 D_{10} 值的菌种组成。假设产品辐照前的初始含菌量为 N_0 ;该菌落总数由 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。则根据公式(2)可以推导出辐照后的剩余含菌量 ΣN 与辐照剂量 D 的关系式为:

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

由公式(3)可知,如果知道菌落总数的抗性分布(D_{10i} 和 p_i),对于给定的辐照前初始含菌量 N_0 ,可以计算出不同辐照剂量 D 下的剩余含菌量 ΣN 。有了 N_0 和 ΣN 可以进一步根据公式(1)计算出相应的 LR 值。对于具有 SDR 的初始含菌量为 $N_0=1 \times 10^8$

CFU/g 的菌落总数, 根据公式(3)和公式(1)可以计算出其不同剂量 D 下的剩余含菌量 ΣN 及对数去除率 LR , 如表 2 所示。

在 LR 坐标下, 根据表 2 的数据可以绘制出具有 SDR 的菌落总数理论上的灭菌剂量曲线。这是一

条在第一象限通过(0, 0)点递增的, 略微下凸的曲线。通过简单计算可以看出, 改变辐照前的初始含菌量 N_0 , 表 2 中辐照后的剩余含菌量 ΣN 会发生变化, 但并不影响 LR 值。因此在 LR 坐标下, 灭菌剂量曲线不受辐照前初始含菌量 N_0 变化的影响。

表 2 具有 SDR 的菌落总数在不同剂量 D 下的剩余含菌量 ΣN 及对数去除率 LR
Table 2 Number and log-reduction of Bioburden having SDR after irradiation under different radiation doses

$D /$ kGy	$\Sigma N /$ CFU·g ⁻¹	LR	$D /$ kGy	$\Sigma N /$ CFU·g ⁻¹	LR	$D /$ kGy	$\Sigma N /$ CFU·g ⁻¹	LR	$D /$ kGy	$\Sigma N /$ CFU·g ⁻¹	LR
0.0	1.0000×10 ⁸	0.00	12.0	4.7409×10 ²	5.32	24.0	1.7059×10 ⁻¹	8.77	36.0	1.2259×10 ⁻⁴	11.91
1.0	1.5842×10 ⁷	0.80	13.0	2.3272×10 ²	5.63	25.0	9.1787×10 ⁻²	9.04	37.0	6.8022×10 ⁻⁵	12.17
2.0	3.3925×10 ⁶	1.47	14.0	1.1568×10 ²	5.94	26.0	4.9581×10 ⁻²	9.30	38.0	3.7799×10 ⁻⁵	12.42
3.0	9.5505×10 ⁵	2.02	15.0	5.8149×10 ¹	6.24	27.0	2.6879×10 ⁻²	9.57	39.0	2.1032×10 ⁻⁵	12.68
4.0	3.2388×10 ⁵	2.49	16.0	2.9528×10 ¹	6.53	28.0	1.4620×10 ⁻²	9.84	40.0	1.1718×10 ⁻⁵	12.93
5.0	1.2313×10 ⁵	2.91	17.0	1.5132×10 ¹	6.82	29.0	7.9758×10 ⁻³	10.10	41.0	6.5362×10 ⁻⁶	13.18
6.0	5.0329×10 ⁴	3.30	18.0	7.8191	7.11	30.0	4.3633×10 ⁻³	10.36	42.0	3.6499×10 ⁻⁶	13.44
7.0	2.1608×10 ⁴	3.67	19.0	4.0709	7.39	31.0	2.3931×10 ⁻³	10.62	43.0	2.0402×10 ⁻⁶	13.69
8.0	9.6150×10 ³	4.02	20.0	2.1340	7.67	32.0	1.3156×10 ⁻³	10.88	44.0	1.1416×10 ⁻⁶	13.94
9.0	4.3974×10 ³	4.36	21.0	1.1257	7.95	33.0	7.2481×10 ⁻⁴	11.14	45.0	6.3931×10 ⁻⁷	14.19
10.0	2.0562×10 ³	4.69	22.0	5.9714×10 ⁻¹	8.22	34.0	4.0012×10 ⁻⁴	11.40	—	—	—
11.0	9.7946×10 ²	5.01	23.0	3.1842×10 ⁻¹	8.50	35.0	2.2129×10 ⁻⁴	11.66	—	—	—

1.4 利用传统线性拟合“ D_{10} 值”法得到的菌落总数“ D_{10} 值”

利用传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数的灭菌剂量时, 首先需要选定一组剂量(例如 0、2、4、6、8 和 10 kGy)对样品进行辐照, 检测不同剂量 D 下的剩余含菌量 N 并计算出 $\lg N$, 然后按照公式(4)进行线性拟合得到菌落总数的“ D_{10} 值”。最后根据公式(5)计算出所需的灭菌剂量。

$$\lg N = \lg N_0 - \frac{1}{D_{10}} \times D \quad (4)$$

$$D = D_{10} \times \lg \left(\frac{N_0}{N} \right) \quad (5)$$

将公式(1)代入公式(5)可得公式(6)。由公式(6)可以看出, 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的灭菌剂量曲线, 在 LR 坐标下, 是一条通过(0, 0)点, 以“ D_{10} 值”为斜率的直线。

$$D = D_{10} \times LR \quad (6)$$

利用传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数的灭菌剂量并未考虑菌落总数抗性分布的影响。由公式(3)可知, 在考虑抗性分布的情况下, 菌落总数的辐照剂量 D 与由剩余含菌量 ΣN 计算出的 $\lg \Sigma N$ 是非线性关系。那么在增量剂量实验中, 选择不同的实验剂量点($D, \lg \Sigma N$), 很可能拟合出不同的“ D_{10} 值”。利用表 2 中具有 SDR 的菌落总数数据, 拟合出不同实验剂量范围、不同剂量间隔对应的“ D_{10} 值”, 结果如表 3 所示。表 3 中共包含了 56 种实验剂量点的选取方案, 剂量范围从 0—1 至 0—20 kGy, 剂量间隔从 1 至 10 kGy。例如剂量范围 0—10 kGy, 剂量间隔为 2 kGy 表示剂量点选取的方案为(0、2、4、6、8 和 10 kGy)。选择这样的剂量范围和剂量间隔是因为在实际的生产实践中, 增量剂量实验的最大辐照剂量一般不超过 20 kGy, 剂量间隔一般不小于 1 kGy。

由表 3 可以看出, 在增量剂量实验中当剂量间隔一定时, 剂量范围选择得越大拟合出的“ D_{10} 值”越大; 当剂量范围一定时, 剂量间隔选择得越大拟合出的“ D_{10} 值”越小。

表 3 不同剂量点选取方案拟合出的“ D_{10} 值”
Table 3 D_{10} values from different dose selection plans

剂量范围 / kGy Dose range	D_{10} / kGy									
	Dose interval1	Dose interval2	Dose interval3	Dose interval4	Dose interval5	Dose interval6	Dose interval7	Dose interval8	Dose interval9	Dose interval10
0-1	1.25	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0-2	1.36	1.36	—	—	—	—	—	—	—	—
0-3	1.49	—	1.49	—	—	—	—	—	—	—
0-4	1.61	1.61	—	1.61	—	—	—	—	—	—
0-5	1.74	—	—	—	1.72	—	—	—	—	—
0-6	1.85	1.83	1.82	—	—	1.82	—	—	—	—
0-7	1.96	—	—	—	—	—	1.91	—	—	—
0-8	2.05	2.03	—	1.99	—	—	—	1.99	—	—
0-9	2.14	—	2.09	—	—	—	—	—	2.07	—
0-10	2.23	2.20	—	—	2.13	—	—	—	—	2.13
0-11	2.30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0-12	2.37	2.34	2.31	2.29	—	2.25	—	—	—	—
0-13	2.44	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0-14	2.50	2.47	—	—	—	—	2.36	—	—	—
0-15	2.56	—	2.49	—	2.44	—	—	—	—	—
0-16	2.61	2.58	—	2.52	—	—	—	2.45	—	—
0-17	2.66	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0-18	2.71	2.67	2.64	—	—	2.57	—	—	2.53	—
0-19	2.75	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0-20	2.80	2.76	—	2.70	2.68	—	—	—	—	2.61

1.5 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的菌落总数灭菌剂量与理论值的比较及有效范围分析

将表 3 中的“ D_{10} 值”代入公式(6)可以得到 LR 坐标下不同剂量点选取方案对应的灭菌剂量曲线。选择剂量间隔为 1 kGy, 剂量范围分别为 0-1、0-10 和 0-20 kGy 的三条灭菌剂量曲线与理论上的灭菌剂量曲线比较得图 1; 选择剂量范围为 0-20 kGy, 剂量间隔分别为 1、5 和 10 kGy 的三条灭菌剂量曲线与理论上的灭菌剂量曲线比较得图 2。

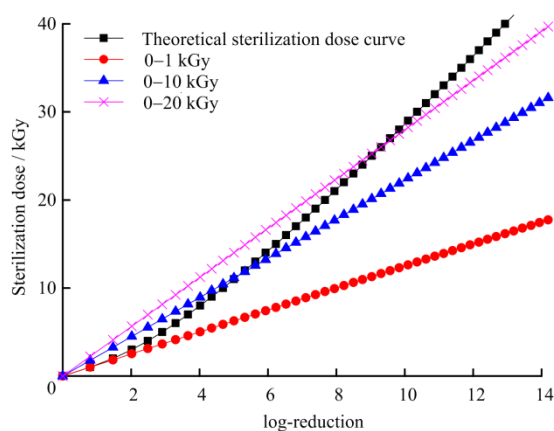


图 1 剂量间隔为 1 kGy 不同剂量范围的灭菌剂量曲线
Fig.1 Sterilization dose curves from different dose ranges of 1 kGy dose interval

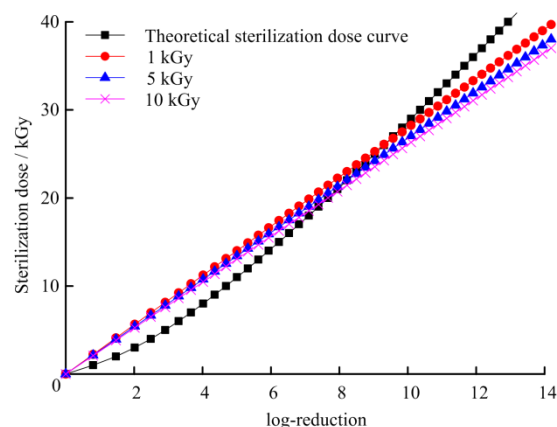


图 2 剂量范围为 0-20 kGy 不同剂量间隔的灭菌剂量曲线
Fig.2 Sterilization dose curves from different dose intervals of 0-20 kGy dose range

由图 1 和图 2 可以看出, 无论在增量剂量实验中使用怎样的剂量点选取方案, 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的菌落总数灭菌剂量曲线在 LR 坐标下, 与菌落总数理论上的灭菌剂量曲线一定有且仅有一个交点。在此交点的左侧, 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的菌落总数灭菌剂量因高于理论值而有效; 而在此交点的右侧, 传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的菌落总数灭菌剂量因低于理论值而失效。该交点即传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌

剂量的有效边界。表 3 中每个“ D_{10} 值”对应的灭菌剂量曲线与理论曲线的交点处剂量如表 4 所示。

由表 4 可以看出，对于每一个剂量范围无论剂量间隔如何，曲线交点剂量均大于或等于所选剂量范围的最大剂量。并且在每一个剂量范围中，随着剂量间隔取得越来越大，曲线交点剂量越来越接近

所选剂量范围的最大剂量。表 4 中剂量范围 0–20 kGy、剂量间隔 1 kGy 的交点剂量为 26.10 kGy，其对应的“ D_{10} 值”为 2.80 kGy。根据公式(6)计算其灭菌剂量曲线，与菌落总数理论上的灭菌剂量曲线对比如图 3 所示。

表 4 以“ D_{10} 值”设定的灭菌剂量曲线与理论曲线的交点剂量
Table 4 The intersection dose of sterilization dose curve from “ D_{10} ” and theoretical sterilization dose curve

剂量范围 / kGy Dose range	交点剂量 / kGy Intersection dose									
	Dose interval1	Dose interval2	Dose interval3	Dose interval4	Dose interval5	Dose interval6	Dose interval7	Dose interval8	Dose interval9	Dose interval10
0–1	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0–2	2.00	2.00	—	—	—	—	—	—	—	—
0–3	3.00	—	3.00	—	—	—	—	—	—	—
0–4	4.10	4.00	—	4.00	—	—	—	—	—	—
0–5	5.20	—	—	—	5.00	—	—	—	—	—
0–6	6.30	6.10	6.00	—	—	6.00	—	—	—	—
0–7	7.60	—	—	—	—	—	7.00	—	—	—
0–8	8.80	8.50	—	8.00	—	—	—	8.00	—	—
0–9	10.20	—	9.40	—	—	—	—	—	9.00	—
0–10	11.50	11.00	—	—	10.00	—	—	—	—	10.00
0–11	12.90	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0–12	14.30	13.60	13.00	12.60	—	12.00	—	—	—	—
0–13	15.70	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0–14	17.20	16.40	—	—	—	—	14.00	—	—	—
0–15	18.60	—	17.00	—	15.80	—	—	—	—	—
0–16	20.10	19.10	—	17.60	—	—	—	16.00	—	—
0–17	21.60	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0–18	23.10	22.00	21.00	—	—	19.00	—	—	18.00	—
0–19	24.60	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0–20	26.10	24.90	—	22.90	22.10	—	—	—	—	20.00

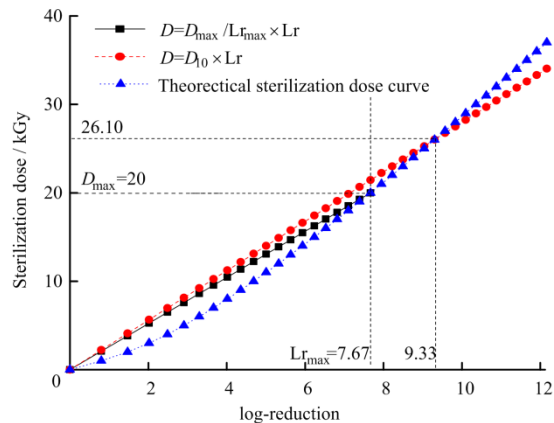


图 3 根据剂量范围为 0–20 kGy 剂量间隔为 1 kGy 的数据拟合的“ D_{10} 值”计算出的灭菌剂量曲线与理论曲线对比
Fig.3 Comparison of theoretical sterilization dose curve and sterilization dose curve from “ D_{10} value” fitted by data of 0–20 kGy dose range and 1 kGy dose interval

1 kGy 的数据拟合的“ D_{10} 值”计算出的灭菌剂量曲线为一条直线，该直线与菌落总数理论上的灭菌剂量曲线相交于一点($LR=9.33$, $D=26.10$ kGy)。设增量剂量实验所选择的剂量范围中最大剂量为 $D_{\max}$ ，此剂量下菌落总数的对数去除率为 $LR_{\max}$ 。则图 3 中最大剂量点在理论曲线上位于($LR_{\max}=7.67$, $D_{\max}=20$ kGy)。根据以上分析可知，随着剂量间隔的增加，曲线交点将从($LR=9.33$, $D=26.10$ kGy)向($LR_{\max}=7.67$, $D_{\max}=20$ kGy)移动。当剂量间隔为 20 kGy 时，曲线交点与最大剂量点正好重合。图 3 中“ D_{10} 值”对应的直线在 $0 \leq LR \leq 7.67$ 范围内处于理论曲线上方，因此其灭菌剂量一定有效； $LR > 9.33$ 时处于理论曲线下方，灭菌剂量一定失效； $7.67 < LR \leq 9.33$ 时虽然灭菌剂量有效，但因曲线交点在实践中难以通过实验确定并且受到剂量间隔选择方案的影响，该范围存在很大的不确定性。

图 3 中，根据剂量范围 0–20 kGy、剂量间隔为

根据以上分析可知,在使用传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数的灭菌剂量时,要确保灭菌剂量有效必须保证所设定的菌落总数的对数去除率 $LR \leq LR_{\max}$, 此时灭菌剂量 $D \leq D_{10} \times LR_{\max}$ 。因此传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌剂量的有效范围为 $LR \in [0, LR_{\max}]$, $D \in [0, D_{10} \times LR_{\max}]$ 。

2 传统线性拟合“ D_{10} 值”法的改进—最大剂量斜率法

2.1 最大剂量斜率法的建立

在图3的例子中,利用传统线性拟合“ D_{10} 值”法,根据剂量范围 0–20 kGy、剂量间隔 1 kGy 的 21 个数据点拟合的“ D_{10} 值”设定的菌落总数灭菌剂量曲线,其有效范围为 $LR \in [0, LR_{\max}=7.67]$ 。 $LR_{\max}$ 为增量剂量实验中选取的剂量范围最大值 $D_{\max}=20$ kGy 所对应的菌落总数对数去除率。在图3中菌落总数理论灭菌剂量曲线上找到剂量范围最大值 $D_{\max}$ 对应的数据点($LR_{\max}=7.67$, $D_{\max}=20$ kGy)与(0, 0)点相连可以得到一条斜率为 $D_{\max} / LR_{\max}$ 的直线,如公式(7)所示。

从图3可以看出,该直线在传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定灭菌剂量的有效范围内($LR \in [0, LR_{\max}]$),处于线性拟合“ D_{10} 值”法设定的灭菌剂量曲线下方同时处于理论灭菌剂量曲线的上方。即在传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定灭菌剂量的有效范围内,以增量剂量实验中选取的剂量范围中最大剂量斜率 $D_{\max} / LR_{\max}$ 确定的灭菌剂量曲线比传统方法设定的灭菌剂量曲线更接近理论值。因此在设定菌落总数灭菌剂量时,选定增量剂量实验的剂量范围(0– $D_{\max}$)后,仅需以剂量范围中最大剂量 $D_{\max}$ 对样品进行辐照,检测其剩余含菌量 N 并计算出 $LR_{\max}$ 值及最大剂量斜率 $D_{\max} / LR_{\max}$, 就可以根据公式(7)设定菌落总数的灭菌剂量。此方法即为最大剂量斜率法。值得注意的是,采用最大剂量斜率法设定菌落总数的灭菌剂量时, LR 的有效范围仍然是 $LR \in [0, LR_{\max}]$, 此时 D 的有效范围变为 $D \in [0, D_{\max}]$ 。

$$D = \frac{D_{\max}}{LR_{\max}} \times LR \quad (7)$$

2.2 最大剂量斜率法的优点

由以上分析可知,与传统线性拟合“ D_{10} 值”法相比,最大剂量斜率法在设定菌落总数灭菌剂量

时有两个优点。一是实验次数大大减少。在增量剂量实验中,选定实验剂量范围(0– $D_{\max}$)后,使用传统方法需要采用剂量范围(0– $D_{\max}$)中多个剂量点辐照样品及检测含菌量,而最大剂量斜率法只需采用一个剂量点 $D_{\max}$ 辐照样品及检测含菌量,实验次数由多次减少为一次。二是最终设定的灭菌剂量更加准确,减少了不必要的过量辐照。

2.3 最大剂量斜率法的使用方式

现举例说明最大剂量斜率法的使用方式,下列所有实验数据均属假设,仅用于说明该方法的使用步骤,并非实际实验结果。假设某产品需要设定其菌落总数的灭菌剂量,要求其灭菌后菌落总数 $\Sigma N < 5000$ CFU/g。

最大剂量斜率的确定分为以下六个步骤:

a)检测实验样品辐照前的菌落总数,假设测得辐照前菌落总数为 $N_0=5.0 \times 10^7$ CFU/g。

b)根据灭菌后菌落总数 $\Sigma N < 5000$ CFU/g 的要求按照公式(1)计算出 $LR=4.00$ 。

c)在表2中查得小于4.00的最近一个 LR 值为3.67,对应的辐照剂量为7.0 kGy。

d)使用 $D_{\max}=7.0$ kGy 对产品进行辐照并检测辐照后菌落总数。

e)如果辐照后菌落总数 ΣN 达到灭菌要求($\Sigma N < 5000$ CFU/g),假设 $\Sigma N=2.0 \times 10^3$ CFU/g,根据公式(1)计算出 $LR_{\max}=4.40$;如果辐照后 ΣN 未达到灭菌要求($\Sigma N > 5000$ CFU/g),则回到步骤d),将 $D_{\max}$ 增加1 kGy,选择未辐照样品重复辐照实验。

f)假设步骤e一次通过,计算出最大剂量斜率 $D_{\max} / LR_{\max}=7.0/4.40=1.59$ kGy。

辐照生产过程中该产品某个批次的灭菌剂量设定分为以下3个步骤:

a)检测该批次产品辐照前的菌落总数,假设检测结果为 $N_0=1.0 \times 10^7$ CFU/g。

b)根据灭菌要求 $\Sigma N < 5000$ CFU/g 计算出 $LR=3.30$ 。

c)判断 LR 是否在有效范围($LR \in [0, LR_{\max}]$)内,如不在有效范围内则无法继续设定灭菌剂量;本例中 $LR < LR_{\max}$, 则根据公式(7)设定灭菌剂量为 $D_{\max} / LR_{\max} \times LR=1.59 \times 3.30=5.25$ kGy。

避免最终灭菌剂量设定时 LR 值超过有效范围的方法有两种。一是在确定最大剂量斜率时,选择所有产品批次中辐照前菌落总数 N_0 最大的产品进

行实验；二是在确定最大剂量斜率时，根据灭菌后菌落总数要求计算出 LR 后，将 LR 值增加 1 或 2，以扩大有效范围 $LR_{\max}$ 。

3 结论

本文选用一个新的坐标— LR 坐标研究菌落总数的灭菌剂量设定问题。通过对具有 SDR 的菌落总数进行理论计算证明，传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定菌落总数灭菌剂量的有效范围为 $LR \in [0, LR_{\max}]$ ， $D \in [0, D_{10} \times LR_{\max}]$ 。其中 LR 为菌落总数在辐照剂量 D 下的对数去除率， $LR_{\max}$ 为增量剂量实验中所选剂量范围中最大剂量 $D_{\max}$ 对应的对数去除率， D_{10} 为通过线性拟合得到的菌落总数“ D_{10} 值”。在此有效范围内，采用最大剂量斜率 $D_{\max} / LR_{\max}$ 设定的灭菌剂量比传统线性拟合“ D_{10} 值”法设定的灭菌剂量更接近理论值。最大剂量斜率法与传统方法相比可以大大减少实验次数，并且更加准确可以减少不必要的过量辐照，是对传统方法的一大改进。

参考文献

- 1 Technical committee ISO/TC 198. ISO 11137-2 Sterilization of health care products—Radiation—Part2: Establishing the sterilization dose [S]. Switzerland: ISO, 2013.
- 2 姚庆完, 刘清芳. 舒肝丸辐照灭菌剂量的设定及辐照后其对大鼠肝功能的评价试验 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, **30**(4): 215-220.
YAO Qingwan, LIU Qingfang. The determination of absorbed doses for sterilization of shu-ganwan and evaluation for effects of irradiated shu-ganwan on liver function of rat [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2012, **30**(4): 215-220.
- 3 袁忠谊, 岳玲, 吴富兰, 等. 电子束和 γ 射线辐照对左归丸粉杀菌效果的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, **30**(2): 93-96.
YUAN Zhongyi, YUE Ling, WU Fulan, *et al.* Sterilizing effect of electron beam and γ -rays on Zuogui powder [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2012, **30**(2): 93-96.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 哈益明, 居华, 王锋, 等. γ 射线辐照控制冷却鸡肉中的致病菌及贮藏期变化研究 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, **27**(5): 275-279.
HA Yiming, JU Hua, WANG Feng, *et al.* Irradiation control of pathogenic bacteria and their growth during storage time in cooled chicken [J]. Journal of Radiation

- Research and Radiation Processing, 2009, **27**(5): 275-279.
- 12 Mustapha M B, Bousselmi 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.

Research on sterilization dose setting of bioburden using maximum dose slope method

GONG Pin TANG Xiaobin CHEN Da

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

ABSTRACT In this paper, coordinate of log-reduction(LR) is selected to solve the problem of radiation sterilization dose setting of bioburden for non health care products. Bioburden having standard distribution resistances(SDR) is used to perform the calculations. “ D_{10} values” of bioburden are fitted according to traditional method from data of total 56 experimental dose selection plans with dose range from 0-1 to 0-20kGy and dose interval from 1 to 10kGy. Afterwards, the corresponding sterilization dose curves under the coordinate of log-reduction are calculated. The calculations show that the effective range of sterilization dose set by traditional method is $LR \leq LR_{\max}$, and $LR_{\max}$ is LR value corresponding to maximum dose($D_{\max}$) in the incremental dose experiment. Within this effective range, the sterilization dose of bioburden set by the slope of maximum dose($D_{\max} / LR_{\max}$) is much closer to the theoretical value than that by “ D_{10} value” of bioburden. Usage of maximum dose slope method could reduce the number of experiments significantly and the sterilization dose of bioburden is more accurate that can reduce the unnecessary radiation dose compared with traditional method. The maximum dose slope method is a great improvement on traditional method.

KEYWORDS Maximum dose slope method, Bioburden, Radiation sterilization, Sterilization dose setting, Coordinate of log-reduction

CLC TL99