

一种包含无菌 PCL 微球的美容产品

技术领域

本发明涉及医疗美容或医用制剂领域，具体涉及一种包含无菌 PCL 微球的美容产品及其制备、灭菌方法。

背景技术

聚己内酯（Polycaprolactone, PCL, CAS 号：24980-41-4）又称聚 ϵ -己内酯，是通过 ϵ -己内酯单体在金属阴离子络合催化剂催化下开环聚合而成的高分子聚合物，通过控制聚合条件，可以获得不同的分子量。其外观为白色固体粉末或颗粒，无毒，不溶于水，易溶于多种极性有机溶剂。PCL 具有良好的生物相容性、良好的有机高聚物相容性，以及良好的生物降解性，可用作细胞生长支持材料，可与多种常规塑料互相兼容，自然环境及体内可完全降解。PCL 降解后的产物为 CO_2 和 H_2O ，对人体无毒。PCL 用作体内植入材料的医美填充剂，可刺激胶原蛋白的生成。基于 PCL 的羧甲基纤维素凝胶注射后可提供即时和持续的丰盈效果。

作为填充剂原料的 PCL 通常被制成微球，其大小、形状、光滑度已被证明对组织反应有很大影响，并决定了反应的程度。当 PCL 微球被制备成规则的、具有光滑表面的球形，可以最大限度地减少炎症的发生；形成的球体越光滑，越有利于皮下注射，高光滑度的微球在刺激皱纹下成纤维细胞逐一包裹的同时，能够减少异物反应的发生。

由于注射美容产品的给药方式是直接注入人体的皮下组织，如果产品表面或者内部携带病原体可导致严重的感染，引起患者严重的不良反应，因此用于人体植入的生物医学填充剂需要灭菌。灭菌不仅需要杀灭或除去微生物繁殖体和芽孢，最大限度提高注射剂的安全性和有效性，还需要保证注射美容产品的形态、稳定性以及临床疗效，因此选择适宜的灭菌方法对保证美容产品质量具有重要意义。过去几十年来，在医疗器械产品和医美注射产品领域已经采用了多种灭菌方法，包括蒸汽处理、加热/高压灭菌、环氧乙烷处理、等离子体灭菌以及电子束辐照（ β 辐照）、 γ 辐照或 X 射线辐照。灭菌方法须与植入物的材料选择相适应，以避免灭菌过程的无效性，降低其对产品的破坏性。

PCL 具有较低的熔融温度（约为 60℃），不能耐受高温。在超过 50℃的情况下，PCL 微球会融化，因此 PCL 微球不适合蒸汽处理和高压灭菌技术，上述方式会损坏材料或者植入物的结构。Cassan 等人评估了有关于 PCL 灭菌的三种低温技术，包括 β 射线辐照灭菌， γ 射线辐照灭菌和 X 射线辐照灭菌，发现辐照会导致分子量降低，结晶度升高，同时微球也会受到辐照的影响，产生形态辐照效应是剂量依赖性的，较高的辐照剂量导致更强的变化。其中发现 γ 辐照似乎是最不合适的方法，而电子束（ β 辐照）的影响较小。

此外，维持注射微球的球体形状及表面光滑度十分重要，一方面可以提高凝胶的流动性，另一方面也可以防止不良异物反应，因为真皮填充物的总体生物相容性是由光滑和规则形状的微粒决定的，这些光滑微粒会刺激胶原蛋白生长，而粗糙、不规则形状的微粒被巨噬细胞和多核巨细胞包围，导致包膜纤维化，抑制胶原蛋白的产生，并且可能导致不良异物反应。

另外，含有 PCL 微球的注射美容产品的其他组成部分注射器部件和 CMC-Na 凝胶也需要灭菌。已知注射器材料如聚丙烯材料在接受辐照灭菌时会变色且变得发脆，因此不适合通过 γ 辐照进行灭菌，EP3685826B1 提及对注射器和注射针以环氧乙烷、过氧化氢等进行灭菌。US10905786B2 提及对注射器采用蒸发的过氧化氢方法灭菌。而关于 CMC 凝胶的灭菌方法，W02011089173A1 提及包含 CMC 微球悬浮液的灭菌阶段通常采用背压式高压灭菌器处理，Tichy 等人评估了蒸汽灭菌和电解质的存在对纤维素衍生物、卡拉胶和黄原胶基水凝胶的流变学和纺织性能的影响。而注射器一旦装填了凝胶注射剂，由于环氧乙烷等气体无法穿过注射器，因此组装后的注射美容产品，无法再使用环氧乙烷灭菌。因此如何有效的对 PCL 微球进行灭菌，同时又能维持微球的球体形状和表面的光滑度，制备出包含无菌 PCL 微球的美容产品是医疗美容领域的一个亟需解决的问题。

发明内容

本发明是一种包含无菌 PCL 微球的美容产品，该产品需要注射到人体内，因此需要对产品本身进行严格的灭菌，特别是 PCL 微球。通过研究 γ 射线和 β 射线辐照灭菌对 PCL 微球的影响，发现 γ 射线的灭菌效果要好于 β 射线。此外还发现，高剂量的 γ 射线和高剂量的 β 射线都会对 PCL 微球本身产生不利的影响，主要是 PCL 微球的表面光滑度和球体的形状发生了变化。因此，在对 PCL 微球进行灭菌时，辐照的方

式和辐照的剂量将是十分重要的。

现有技术多是采用光学显微或电镜来观察微球的表面光滑度和球体的形状（例如观察微球表面光不光滑，球体圆不圆等），主观性较强，没有一个量化的指标，实际生产过程中也难以做到实时监控和准确控制。本发明为了克服上述问题，采用了 Sysmex 3000 颗粒形态和粒度分析仪，结合流动颗粒图像分析技术 (FPIA) 来检测 PCL 微球的圆整度，通过量化指标，既能对微球的球体形状进行表征，又能兼顾到表面光滑度，并且能够在实际生产中进行质量控制，有效的满足了对无菌 PCL 微球的质量要求。

本发明涉及一种含有无菌 PCL 微球的美容产品，包含无菌 PCL 微球，所述无菌 PCL 微球采用辐照灭菌处理，其表面光滑，呈球形，平均粒径范围为 26-46 μm ，优选 28-42 μm ，圆整度 ≥ 0.96 ，优选 0.97 以上、0.98 以上、0.99 以上。

如前所述的美容产品，所述无菌 PCL 微球采用 γ 或 β 射线辐照灭菌处理得到；优选采用 γ 射线辐照灭菌所述辐照的剂量为 20kGy-30kGy，优选所述辐照的剂量为 20kGy、25kGy 或 30kGy。

如前所述的美容产品，所述无菌 PCL 微球中粒径为 25-50 μm 的微球占比 $\geq 65\%$ ，粒径小于 25 μm 的微球占比 $\leq 20\%$ ，粒径大于 50 μm 的微球占比 $\leq 15\%$ ；优选，粒径为 25-50 μm 的微球占比 $\geq 70\%$ ，粒径小于 20 μm 的微球占比 $\leq 1\%$ ，粒径为 20-25 μm 的微球占比 $\leq 15\%$ ，粒径大于 50 μm 的微球占比 $\leq 14\%$ 。上述粒径分布的微球可以大幅减少异物肉芽肿的发生率，提高美容产品的生物安全性。

如前所述的美容产品，所述无菌 PCL 微球的重均分子量为 8k-8 万 Da，例如 1 万 Da、2 万 Da、3 万 Da、4 万 Da、6 万 Da、8 万 Da，优选 1-4 万 Da。分子量分布系数为 1.5-3.0，优选 1.8-2.5。采用上述重均分子量的美容产品其在人体内的降解时间大于 12 个月、18 个月、24 个月、48 个月。

如前所述的美容产品，辐照前后 PCL 微球的圆整度变化率 $\leq 3.5\%$ ，优选 $\leq 3\%$ 、2.5% 或 2%。

如前所述的美容产品，还包含湿热灭菌法灭菌处理得到的 CMC-Na 凝胶。

如前所述的美容产品，还包括无菌处理的注射器。

一种制备权利要求 1 中的无菌 PCL 微球的方法，经辐照灭菌处理得到无菌 PCL 微球的步骤具体如下：

步骤 1：称取适量 PCL 微球放置于离心管中，并在离心管上做好辐照剂量与微球种类的标记；

步骤 2: 为保证无菌状态和检测中不泄露样品, 使用封口膜对离心管进行密封;

步骤 3: 把离心管装入包装箱内, 并在箱外贴上标签, 标注灭菌剂量信息;

步骤 4: 接受 γ 射线或 β 射线辐照。

如前所述的方法, 其中辐照剂量为 20kGy、25kGy 或 30kGy。

一种制备如前所述的 PCL 微球的方法, 具体步骤如下:

将 PCL 材料溶解于 DCM 中形成油相; 将所述油相逐滴搅拌加入到 MC 溶液中, 利用高速剪切搅拌机高速剪切, 搅拌 2-4 h; 水洗离心 3 次, 筛分、干燥得到; 其中, 油相与水相比例为 1:5~1:50, 优选 1:8~1:30, 更优选 1:10~1:20; 所述油相中聚己内酯的质量浓度为 10mg/ml~50mg/ml, 优选 15mg/ml~30mg/ml, 更优选 15mg/ml~25mg/ml。

如前所述的方法, 针对 4-8 万重均分子量的 PCL, 在高速剪切的步骤之后还有超声的步骤; 所述超声的时间为 3-6 分钟。

如前所述的方法, 高速剪切的转速大于 12000 r/min, 时间为 1-5min。

如前所述的方法, 搅拌时转速 800-1200 r/min, 时间为 2-4h。

一种制备如前所述的含有无菌 PCL 微球的美容产品的方法, 包括将无菌 PCL 微球与通过湿热灭菌法灭菌后得到的 CMC-Na 凝胶混匀的步骤。

如前所述的制备方法, 所述混匀步骤包括: 在真空条件下进行混匀。

如前所述的制备方法, 所述混匀过程采用行星搅拌机或真空搅拌脱泡机。

一种制备如前所述的 CMC-Na 凝胶的方法, 具体步骤如下:

步骤 1: 制造完成后, 将凝胶转移到容器中, 并将其放入高压灭菌器中;

步骤 2: 采用高压蒸汽灭菌法, 其中蒸汽压为 101-105 千帕, 温度为 119-123℃, 维持 15-20 分钟进行蒸汽灭菌。

一种制备如前所述的美容产品的方法, 具体步骤如下:

步骤 1: 通过辐照灭菌得到无菌 PCL 微球; 通过湿热灭菌法灭菌得到 CMC-Na 凝胶; 对注射器采用环氧乙烷灭菌;

步骤 2: 将灭菌后的所述无菌 PCL 微球加入到 CMC-Na 凝胶中进行混匀;

步骤 3: 将混匀的负载有无菌 PCL 微球的 CMC-Na 凝胶封装于所述注射器中。

本发明有益的技术效果:

采用一定剂量的 γ 或 β 射线辐照得到的无菌 PCL 微球, 菌落数检测值可达到“未检出”水平; 尤其当采用 20 kGy-30kGy 的 γ 或 β 射线对重均分子量 1-4 万道尔顿的

PCL 微球进行辐照时，通过电镜照片可以看到其表面的凹陷和沟壑较少，对 PCL 微球的表面光滑度和圆整度的影响较小，不易引起皮肤肉芽肿和炎症反应。将辐照灭菌后的无菌 PCL 微球与湿热灭菌后得到的 CMC-Na 凝胶混匀后灌装到经环氧乙烷灭菌过的注射器后形成的无菌美容产品，不仅可以满足无菌注射的需要，也能更好地保证产品质量，减少炎症反应等副作用的产生。

附图说明

图 1 中 a 和 b 分别为实施例 1 中 PCL 微球的扫描电镜照片和显微镜照片。

图 2 为 1 万 Da 重均分子量 PCL 微球的扫描电镜照片。

图 3 中 a 至 d 为 1 万 Da 重均分子量 PCL 为微球经 15、20、30 或 40kGy 的 γ 射线灭菌后的电镜照片。

图 4 为 4 万 Da 重均分子量 PCL 微球经 30kGy 的 γ 射线灭菌后的电镜照片。

图 5 中 a 至 b 为 1 万 Da 重均分子量 PCL 为微球经 30 或 40kGy 的 β 射线灭菌后的电镜照片。

具体实施方式

以下通过实施例和对比例来进一步说明本发明，但并不限于此。

实施例 1：PCL 微球的制备

原料：重均分子量 1 万 Da 和 4 万 Da 的 PCL 材料各 500 mg，2.5 mL DCM，25mL 1% MC 溶液。

步骤：将 500mg PCL 材料涡旋溶解于 2.5ml DCM 中形成油相；将所述油相一边搅拌一边逐滴加入到 25ml 1% MC 溶液中，再搅拌 30s，后利用高速剪切搅拌机（大龙兴创 D-160）2 档（14000r/min）剪切 1min，超声 5min，搅拌（1000r/min）3 h；水洗离心（10000r/min）3 次，每次 15min，筛分，干燥 24h。制得的 PCL 微球大小均匀、粒径合适。图 1a 和图 1b 分别为 PCL 微球的扫描电镜照片和显微镜照片（显微镜 BM200010x）。

实施例 2：灭菌前 PCL 微球的检测

利用实施例 1 的方法制备的 PCL 微球，首先在显微镜下观察，发现制备的 PCL 微球粒径大小均匀合适（参见图 1a、图 2）。

本发明对灭菌前后 1 万 Da 和 4 万 Da 的 PCL 微球的粒径、分子量分布系数、结晶

度、圆整度和菌落数进行了检测。分别利用形态粒度分析仪 (Topsizerplus) 对 PCL 微球的粒径范围进行检测; 利用凝胶渗透色谱 (GPC) 对 PCL 微球的分子量分布系数进行检测; 利用差示扫描量热仪 (DSC) 对 PCL 微球的结晶度进行检测; 利用流动颗粒图像分析技术 (FPIA) 对 PCL 微球圆整度和变化率进行检测; 利用菌落计数的方法对灭菌前、后 PCL 微球的菌落数进行检测。

(1) 粒径检测: 利用形态粒度分析仪对 PCL 微球的粒径范围进行检测, 过程如下:

称取 0.1g 微球置于离心管中, 加入 10ml 水, 振荡、分散, 超声处理 30min, 再分散到预装 500mL 去离子水的烧杯中, 使用欧美克粒径仪测定粒径, 测定三次, 取平均值。

经检测分析发现, 灭菌前重均分子量为 1 万 Da 的 PCL 微球的平均粒径为 35.40 μm , 粒径小于 20 μm 的 PCL 微球占比 0.66%, 粒径 20-25 μm 的 PCL 微球占比 18.77%, 粒径 25-50 μm 的 PCL 微球占比 65.60%, 粒径大于 50 μm 的 PCL 微球占比 14.97%; 灭菌前重均分子量为 4 万 Da 的 PCL 微球的平均粒径为 37.12 μm , 粒径小于 20 μm 的 PCL 微球占比 0.62%, 粒径 20-25 μm 的 PCL 微球占比 14.73%, 粒径 25-50 μm 的 PCL 微球占比 70.67%, 粒径大于 50 μm 的 PCL 微球占比 13.98%。

(2) 分子量分布系数检测: 利用凝胶渗透色谱 (GPC) 对 PCL 微球的分子量分布系数进行检测, 具体检测步骤如下:

仪器型号: Agilent 1260 Infinity

检测器: Agilent 1260 RID

色谱柱: Waters Styragel HR 5E (7.8*300mm, 2000-400w) 和 Waters Styragel HR 2 (7.8*300mm, 500-2w) 串联

柱温: 35°C

软件: ChemStation for LC systems

标准品: PS (聚苯乙烯)。

称取一定量 PCL 微球用四氢呋喃溶剂溶解、过滤, 待仪器稳定后用进样针筒注入进样口, 待色谱柱淋洗后, 得到完整的 GPC 曲线, 根据测得的 GPC 曲线计算分子量及其分子量分布系数。

经检测分析发现, 灭菌前重均分子量为 1 万 Da 的 PCL 微球, 其分子量分布系数(PDI) 为: 2.1652; 灭菌前重均分子量为 4 万 Da 的 PCL 微球, 分子量分布系数 (PDI) 为: 1.8001。

(3) 结晶度检测：利用差示扫描量热仪（DSC）对 PCL 微球的结晶度进行检测，具体检测步骤如下：

使用差示扫描量热仪（CED-E-DSC-045DSC250），先将 PCL 微球升温到 80℃，恒温 10min，然后以相同的速度冷却到-40℃，在氮气保护下，记录-40℃到 80℃的升温扫描曲线，升温速度 10℃/min，结晶度按比熔融热焓法计算： $f = \Delta H_m / \Delta H_{m,c}$ ，其中 ΔH_m 为 DSC 分析曲线计算峰面积得到的熔融焓， $\Delta H_{m,c}$ 为 100%结晶 PCL 的熔融焓，依据文献报道的数值 139.5J/g 来计算。检测结果为：重均分子量 1 万 Da 的 PCL 微球，其结晶度为 70.2266%；重均分子量 4 万 Da 的 PCL 微球，其结晶度为 64.9681%。

(4) 圆整度及其变化率的检测：利用 Sysmex 3000 颗粒形态和粒度分析仪(英国 Malvern Instruments)，结合流动颗粒图像分析技术(FPIA)检测微球的圆整度。具体步骤为：

将 PCL 微球分散于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中，形成稀释分散体，该分散体适用于 FPIA 分析。在近千个单颗粒通过 Sysmex 3000 颗粒形态和粒度分析仪流通池时，流动颗粒图像分析软件对这些颗粒进行二维拍摄。FPIA 计算颗粒的二维面积，并生成一个具有相同二维面积的正圆。然后，它计算出该正圆的周长，将其与颗粒边缘的实际总长度进行对比。圆整度是正圆周长与颗粒边缘实际总长度的比值。如果样本颗粒是一个正圆，则该比值为 1。颗粒形状越不规则，表面越不光滑，该比值就越小于 1。该方法计算出的样本平均圆整度始终位于 0 和 1 之间。软件将自动计算出一次测试中 1000-2000 个微球的平均的圆整度，计算平均值。经检测，1 万 Da 和 4 万 Da 的 PCL 微球的圆整度均高于 0.99（分别达到了 0.9951、0.9967）。

圆整度变化率为灭菌前后的圆整度变化量与灭菌前圆整度的比值：(灭菌前圆整度-灭菌后圆整度)/灭菌前圆整度。

(5) 菌落数测定方法：

步骤 1：样品的稀释。称取一定量的 PCL 微球样品置盛有磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。用无菌吸管或微量移液器吸取 1：10 样品匀液，沿管壁缓慢注于盛有稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1：100 的样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次无菌吸管或吸头。根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，吸取 1mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，

分别吸取 1mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。及时将 15mL~20mL 冷却至 46℃的平板计数琼脂培养基（可放置 46℃±1℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

步骤 2：培养。待琼脂凝固后，将平板翻转，36℃±1 培养 48h±2h。

步骤 3：菌落计数。菌落计数以菌落形成单位(colony-formingunits, CFU)表示。选取菌落数在 30CFU~300CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。经菌落计数：灭菌前 1 万 Da 和 4 万 Da 分子量的 PCL 微球均有菌落检出，且菌落数<100（等级）。

实施例 3：利用 γ 射线对 PCL 微球进行灭菌

PCL 微球的辐照灭菌步骤具体如下：

步骤 1：称取适量微球放置于离心管中，并在离心管上做好辐照剂量与微球种类的标记；

步骤 2：为保证无菌状态和检测途中不泄露样品，使用封口膜对离心管进行密封；

步骤 3：把需要灭菌的相同辐照剂量的离心管装入包装箱内进行，并在箱外贴上标签，标注灭菌剂量信息；

步骤 4：封装好的 PCL 微球的包装分组接受 γ 射线（Co60）不同剂量的辐照。

选用 15、20、30、40kGy 等 4 种剂量进行辐照，并对辐照后的 PCL 微球进行进一步地检测和分析，检测方法和步骤如实施例 2 中所示。

检测结果如下：

表 1：1 万 Da 重均分子量的无菌 PCL 微球

辐照剂 量	菌落 数	粒径范围	分子量分布 系数 PDI	结晶度	圆整 度	圆整度变 化率
15kGy	<5	平均粒径 35.33μm； 小于 20μm 的微球占 比 0.71% 20-25μm 的微球占比 18.79% 25-50μm 的微球占比 65.63%	2.1726	74.3774%	0.9892	0.59%

		大于 50 μm 的微球占比 14.87%				
20kGy	未检出	平均粒径 35.22 μm ; 小于 20 μm 的微球占比 0.77% 20-25 μm 的微球占比 18.68% 25-50 μm 的微球占比 66.02% 大于 50 μm 的微球占比 14.53%	2.1787	74.7471%	0.9765	1.87%
30kGy	未检出	平均粒径 35.14 μm ; 小于 20 μm 的微球占比 0.83% 20-25 μm 的微球占比 18.65% 25-50 μm 的微球占比 66.43% 大于 50 μm 的微球占比 14.09%	2.1816	75.5367%	0.9675	2.77%
40kGy	未检出	平均粒径 35.05 μm ; 小于 20 μm 的微球占比 0.89% 20-25 μm 的微球占比 18.72% 25-50 μm 的微球占比 66.52% 大于 50 μm 的微球占比 13.87%	2.1950	77.2368%	0.9547	4.06%

表 2: 4 万 Da 重均分子量的无菌 PCL 微球

辐照剂 量	菌落 数	灭菌后测得的粒径范 围	分子 量分 布系 数 PDI	结晶度	圆整 度	圆整度变化 率
15kGy	<5	平均粒径 37.07 μm; 小于 20 μm 的微球占比 0.75% 20-25 μm 的微球占比 14.71% 25-50 μm 的微球占比 70.65% 大于 50 μm 的微球占比 13.89%	1.857 3	69.4684 %	0.985 5	1.12%
20kGy	未检 出	平均粒径 36.91 μm; 小于 20 μm 的微球占比 0.81% 20-25 μm 的微球占比 14.82% 25-50 μm 的微球占比 70.74% 大于 50 μm 的微球占比 13.63%	1.878 6	70.2789 %	0.974 3	2.25%
30kGy	未检 出	平均粒径 36.82 μm; 小于 20 μm 的微球占比 0.89% 20-25 μm 的微球占比 14.91% 25-50 μm 的微球占比	1.892 5	70.7787 %	0.961 8	3.50%

		70.99% 大于 50μm 的微球占比 13.21%				
40kGy	未检出	平均粒径 36.79μm ; 小于 20μm 的微球占比 0.96% 20-25μm 的微球占比 14.83% 25-50μm 的微球占比 71.34% 大于 50μm 的微球占比 12.87%	1.911 7	74.4983 %	0.950 1	4.68%

通过上述结果可以看出，经过 γ 射线辐照灭菌，PCL 微球中的菌落数显著减少，这说明 γ 射线辐照可以有效地对 PCL 微球进行灭菌。

通过比较 γ 射线各个剂量的实验结果可以看出，当采用 15kGy 的 γ 射线对 PCL 微球进行辐照灭菌时，其菌落数（等级）降至<5，虽然菌落数已经较低，但是对于一款注射入人体皮肤的美容产品而言，细菌污染将严重影响产品质量，未完全灭菌的产品也将会导致严重的炎症反应。因此，菌落数需控制在“未检出”的标准。通过表 1-2 可以看出，当 γ 射线的剂量达到 20kGy 以上时，菌落数检测即达到“未检出”水平，可以满足产品无菌的要求。

通过对 PCL 微球的分子量的分布系数、结晶度、圆整度、圆整度变化率和表面光滑度（显微镜及扫描电镜观察）进行分析后发现： γ 射线灭菌后，PCL 微球的分子量分布系数有所增大，结晶度也有所增大。特别是结晶度的变化，由于测量到的结晶度是一个平均值，是一个高低结晶度平均化的结果，猜测微球内部可能发生了不均匀的结晶度改变，而局部的结晶度升高，很可能会引起局部体积的塌陷，从而导致 PCL 微球的表面变得不光滑，形成一定裂痕或者小坑。这一点通过扫描电子显微镜也可以得到印证（如附图 3a 至 3d 及图 4 所示），其中图 3a 至 3d 为 1 万 Da 的 PCL 微球经 15、20、30、40 kGy 的 γ 射线辐照后的电镜照片。经 15kGy γ 射线辐照后的微球，圆整度值为 0.9892，圆整度变化率为 0.59%。通过电镜照片图 3a 可以看到，微球上出现少

量裂痕,但是微球整体变化不大。经过 20kGy 和 30kGy 的 γ 射线辐照后,微球的圆整度值分别降为 0.9765 和 0.9675,圆整度变化率分别为 1.87%和 2.77%。如图 3b 和 3c 所示,PCL 微球变化更加明显,微球表面出现了多条裂痕以及凹陷,但是通过电镜照片可以看到微球整体球形度变化不大,仍然维持了较好的球体形状。

当采用 40 kGy 的 γ 射线辐照灭菌时,发现 PCL 微球的分子量分布系数、结晶度和圆整度值变化更大。圆整度值降为<0.96 (0.9547),圆整度变化率达到 4.06%。通过电镜照片图 3d 也可以看到,辐照后的 PCL 微球表面出现了大量的裂痕和凹陷,微球出现明显皱缩,很多皱缩已经导致球体形状发生改变,部分微球无法形成完整的球体。而本领域知晓,当微球的表面光滑度和球体形状较差时,粗糙和不规则形状的微球会被巨噬细胞和多核巨细胞包围,导致包膜纤维化,抑制胶原蛋白的产生,并且导致不良异物反应。

此外,重均分子量 4 万 Da 的 PCL 微球比 1 万 Da 的 PCL 微球,更易受到 γ 射线辐照的影响。这从表 1 和表 2 的圆整度值和圆整度变化率可以看出,对于不同分子量的 PCL 微球,重均分子量 1 万 Da 的 PCL 微球在 30kGy 的 γ 射线辐照下,圆整度为 0.9675,圆整度变化率为 2.77%,而 4 万 Da 的 PCL 微球在 30kGy 的 γ 射线辐照下,圆整度为 0.9618,圆整度变化率为 3.50%。通过电镜照片观察也证明了这一点,图 4 显示了 4 万 Da 的 PCL 微球在 30kGy 的 γ 射线辐照下的电镜照片,可以看到微球表面的裂痕和凹陷要多于同剂量下 1 万 Da 的 PCL 微球(图 3c)。这些都印证了高分子量的 PCL 微球更易受到辐照的影响。

实施例 4: 利用 β 射线灭菌得到无菌 PCL 微球

PCL 微球辐照灭菌的方法与实施例 3 所采用的步骤基本相同,不同点为灭菌所采用的辐照射线是 β 射线(电子加速器)。

选用 15、20、30 或 40kGy 四种剂量进行辐照,并对 β 射线辐照后的 PCL 微球进行分析和检测。其中,40kGy 以上的剂量即无菌落检出。

表 3: 1 万 Da 重均分子量的无菌 PCL 微球:

辐照剂量	菌落数	粒径范围	分子量分布系数 PDI	结晶度	圆整度	圆整度变化率
15kGy	<10	平均粒径 35.41 μ m; 小于 20 μ m 的微球占比 0.75%	2.1820	73.3479%	0.9910	0.41%

		20-25μm 的微球占比 18.61% 25-50μm 的微球占比 65.75% 大于 50μm 的微球占 比 14.89%				
20kGy	<10	平均粒径 35.33μm ; 小于 20μm 的微球占 比 0.79% 20-25μm 的微球占比 18.59% 25-50μm 的微球占比 66.27% 大于 50μm 的微球占 比 14.35%	2.1918	73.7378%	0.9875	0.76%
30kGy	<5	平均粒径 35.25μm ; 小于 20μm 的微球占 比 0.85% 20-25μm 的微球占比 18.61% 25-50μm 的微球占比 66.50% 大于 50μm 的微球占 比 14.04%	2.1998	74.2581%	0.9691	2.61%
40kGy	未检 出	平均粒径 35.13μm ; 小于 20μm 的微球占 比 0.92% 20-25μm 的微球占比 18.62% 25-50μm 的微球占比	2.2270	76.2773%	0.9568	3.85%

		66.63% 大于 50μm 的微球占 比 13.83%				
--	--	---	--	--	--	--

表 4：4 万 Da 重均分子量的无菌 PCL 微球：

辐照剂 量	菌落数	粒径范围	分子量分布 系数 PDI	结晶度	圆整度	圆整度变 化率
15kGy	<10	平均粒径 37.13μm ； 小于 20μm 的微球 占比 0.78% 20-25μm 的微球占 比 14.69% 25-50μm 的微球占 比 70.63% 大于 50μm 的微球 占比 13.90%	1.8673	69.1996%	0.9901	0.66%
20kGy	<10	平均粒径 37.01μm ； 小于 20μm 的微球 占比 0.82% 20-25μm 的微球占 比 14.79% 25-50μm 的微球占 比 70.86% 大于 50μm 的微球 占比 13.53%	1.8896	69.4893%	0.9856	1.11%
30kGy	<5	平均粒径 36.94μm ； 小于 20μm 的微球 占比 0.87% 20-25μm 的微球占 比 14.87%	1.9026	70.0297%	0.9662	3.06%

		25-50μm 的微球占比 71.14% 大于 50μm 的微球占比 13.12%				
40kGy	未检出	平均粒径 36.83μm; 小于 20μm 的微球占比 0.98% 20-25μm 的微球占比 14.98% 25-50μm 的微球占比 71.23% 大于 50μm 的微球占比 12.81%	1.9212	73.0384%	0.9563	4.05%

通过上述结果可以看出，经过 β 射线辐照灭菌，PCL 微球中的菌落数明显减少，随着剂量的增加，菌落数逐渐减少，其中 1 万 Da 或 4 万 Da 重均分子量的 PCL 微球均由灭菌前的<100（等级）分别降低到<10、<10、<5、未检出，这说明 β 射线辐照也可以对 PCL 微球进行灭菌，但是其灭菌效果并没有同剂量下的 γ 射线好。通过对 PCL 微球的分子量分布系数、结晶度、圆整度和圆整度变化率进行分析后发现：灭菌前后，PCL 微球的分子量分布系数有所增大，结晶度也有所增大。通过表 3-4 可以看出，采用 30 kGy 的 β 射线对 1 万 Da 分子量的 PCL 微球进行辐照灭菌时，PCL 微球的分子量分布系数、结晶度和圆整度均受到了辐照影响，圆整度>0.96（0.9691），圆整度变化率为 2.61%，而 4 万 Da 分子量的 PCL 微球，圆整度>0.96（0.9662），圆整度变化率为 3.06%。通过附图 5a 可以看出，虽然 1 万 Da 分子量的 PCL 微球的表面也出现了凹陷和沟壑，但是球体形状维持较好，球体表面整体仍较为光滑。由于 4 万 Da 分子量的 PCL 微球，其辐照影响与 1 万 Da 分子量的 PCL 微球差异不大，只是破坏程度上有些许增加，简略起见不再附图展示。

当采用 40kGy 剂量的 β 射线对 PCL 微球进行辐照灭菌时，通过表 3-4 可以看出，不论是 1 万 Da 还是 4 万 Da 的 PCL 微球的表面光滑度和圆整度均受到了辐照较大的影响，圆整度均<0.96（0.9568，0.9563），圆整度变化率分别达到 3.85%、4.05%。可

见，类似于 γ 辐照的情况，重均分子量 4 万 Da 的 PCL 微球比 1 万 Da 的 PCL 微球更易受到 β 射线辐照的影响。通过附图 5b 可以看出，对于 1 万 Da 的 PCL 微球，其表面已出现了明显的凹陷和沟壑，球体形状也发生了改变。这对保证 PCL 微球的表面光滑度和球体形状，减少异物不良反应是十分不利的。因此，尽管该剂量下可以实现达到“未检出”的灭菌要求，但本申请仍不建议采用 40kGy 剂量的 β 射线对 PCL 微球进行辐照灭菌。

此外，由于 15 和 20kGy 的 β 射线辐照无论是在分子量分布系数、结晶度、圆整度、圆整度变化率上对 PCL 微球的影响均小于 30kGy，为避免重复描述，说明书中不再赘述。

综上，采用 β 射线辐照灭菌的效果不如 γ 射线。当采用 15-30kGy 剂量的 β 射线进行灭菌时，其灭菌效果欠佳，微球中仍有细菌残留，而采用 40kGy 高剂量的 β 射线对 PCL 微球灭菌时，对微球的圆整度和表面光滑度影响较大，综合来看，选择 20-30kGy 剂量的 γ 射线对重均分子量 1-4 万 Da 的 PCL 微球进行辐照灭菌是最有利的。

实施例 5：CMC-Na 凝胶灭菌

因为辐照灭菌对 CMC-Na 的粘度有严重影响，因而基于羧甲基纤维素钠（CMC-Na）的载体凝胶不能耐受射线辐照的灭菌。故所述 CMC-Na 凝胶灭菌选择湿热蒸汽灭菌，即高压蒸汽灭菌法，蒸汽压约为 101-105 千帕，温度为 119-123℃，维持 15-20 分钟；具体步骤如下：

步骤 1：CMC-Na 凝胶制备完成后，将其转移到混合容器中，再将其放入高压灭菌器中；

步骤 2：采用高压蒸汽灭菌法，其中蒸汽压约为 101-105 千帕，温度为 119-123℃，维持 15-20 分钟进行蒸汽灭菌。

实施例 6：将无菌 PCL 微球和灭菌处理得到的 CMC-Na 凝胶混合形成无菌美容产品

步骤 1、量取 10ml 凝胶，倒入离心管中，使用刮刀仔细刮取量筒壁上粘附的凝胶，将其转移到离心管中，直至凝胶挂壁损失最小为止；

步骤 2、向凝胶中加入称量好的 3g 的微球，并使用玻璃棒或细刮刀进行初步搅拌，粘附在搅拌棒上的微球凝胶要刮回离心管边缘以保证损失最小；

步骤 3、准备好初步混合好的样品，使用真空搅拌脱泡机进行搅拌除气泡处理。

实施例 7：将美容产品注入灭菌后的注射器中，形成无菌注射美容产品

注射器和针头帽以无菌方式进入 LAF 层流气流装置（Laminar Air Flow）。通过

灌注的方式将美容产品充入注射器，到达正确的体积，并连接端盖以形成无菌屏障。
所有混合和填充步骤均在 ISO 5 级 LAF 装置中无菌进行，贴上标签，从而得到无菌注射美容产品，然后储存。

权 利 要 求 书

1. 一种含有无菌 PCL 微球的美容产品，其特征在于：包含无菌 PCL 微球，所述无菌 PCL 微球采用辐照灭菌处理，其表面光滑，平均粒径范围为 **26-46 μm** ，圆整度 ≥ 0.96 。
2. 如权利要求 1 所述的一种含有无菌 PCL 微球的美容产品，其特征在于：所述的无菌 PCL 微球圆整度 ≥ 0.97 。
3. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球采用 γ 或 β 射线辐照灭菌处理得到。
4. 如权利要求 3 所述的美容产品，其特征在于：所述辐照灭菌采用 γ 射线，所述辐照的剂量为 **20 kGy-30kGy**。
5. 如权利要求 4 所述的美容产品，其特征在于：所述辐照的剂量为 **20kGy、25kGy 或 30kGy**。
6. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球中粒径为 **25-50 μm** 的微球占比 $\geq 65\%$ ，粒径小于 **25 μm** 的微球占比 $\leq 20\%$ 。
7. 如权利要求 6 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球中粒径大于 **50 μm** 的微球占比 $\leq 15\%$ 。
8. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球的重均分子量为 **8k-8 万 Da**。
9. 如权利要求 8 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球的重均分子量为 **1-4 万 Da**。
10. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球的分子量分布系数 PDI 为 **1.5-3.0**。
11. 如权利要求 10 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球的分子量分布系数 PDI 为 **1.8-2.5**。
12. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：所述无菌 PCL 微球的圆整度 ≥ 0.97 。
13. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：辐照前后 PCL 微球的圆整度变化率 $\leq 3.5\%$ 。
14. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：辐照前后 PCL 微球的圆整度变化率 $\leq 2.5\%$ 。
15. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：还包含湿热灭菌法灭菌处理得

到的无菌 CMC-Na 凝胶。

16. 如权利要求 1 所述的美容产品，其特征在于：还包括无菌处理的注射器。

17. 一种制备如权利要求 1 所述的含有无菌 PCL 微球的美容产品的方法，其特征在于：包括将无菌 PCL 微球与通过湿热灭菌法灭菌后得到的无菌 CMC-Na 凝胶混匀的步骤。

18. 一种制备如权利要求 1 中所述的无菌 PCL 微球的方法，其特征在于：经辐照灭菌处理得到无菌 PCL 微球的步骤具体如下：

步骤 1：称取适量 PCL 微球放置于离心管中，并在离心管上做好辐照剂量与微球种类的标记；

步骤 2：为保证无菌状态和检测中不泄露，使用封口膜对离心管进行密封；

步骤 3：把离心管装入包装箱内，并在箱外贴上标签，标注灭菌剂量信息；

步骤 4：接受 γ 射线或 β 射线辐照。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其中辐照剂量为 20-30kGy。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中辐照剂量为 20kGy、25kGy 或 30kGy。

21. 一种制备权利要求 17 所述的无菌 CMC-Na 凝胶的方法，其特征在于：具体步骤如下：

步骤 1：将凝胶转移到待灭菌容器中，并将其放入高压灭菌锅中；

步骤 2：采用高压蒸汽灭菌法，其中蒸汽压为 101-105 千帕，温度为 119-123℃，维持 15-20 分钟进行蒸汽灭菌。

22. 如权利要求 21 所述的制备方法，其特征在于：所述混匀步骤包括：在真空条件下进行混匀。

23. 如权利要求 21 所述的制备方法，其特征在于：所述混匀步骤采用行星搅拌机或真空搅拌脱泡机实施混匀。

24. 一种制备权利要求 1 所述的美容产品的方法，其特征在于：具体步骤如下：

步骤 1：通过辐照灭菌得到无菌 PCL 微球；通过湿热灭菌法灭菌得到灭菌后的 CMC-Na 凝胶；对注射器采用环氧乙烷灭菌；

步骤 2：将灭菌后的所述无菌 PCL 微球加入到 CMC-Na 凝胶中进行混匀；

步骤 3：将混匀的负载有无菌 PCL 微球的 CMC-Na 凝胶封装于所述注射器中。

25. 一种制备权利要求 1 中的 PCL 微球的方法，其特征在于：具体步骤如下：

将 PCL 材料溶解于 DCM 中形成油相；将所述油相逐滴搅拌加入到 MC 溶液中，

利用高速剪切搅拌机高速剪切，搅拌 **2-4 h**；水洗离心 **3** 次，筛分、干燥得到 PCL 微球；其中，油相与水相比比例为 **1:5~1:50**；所述油相中聚己内酯的质量浓度为 **10mg/ml~50mg/ml**。

26. 如权利要求 **25** 所述的方法，其特征在于：在高速剪切的步骤之后还有超声的步骤。

27. 如权利要求 **25** 所述的方法，其特征在于：高速剪切的转速大于 **12000 r/min**，时间为 **1-5min**。

28. 如权利要求 **25** 所述的方法，其特征在于：所述超声的时间为 **3-6** 分钟。

29. 如权利要求 **25** 所述的方法，其特征在于：搅拌时转速 **800-1200 r/min**，时间为 **2-4h**。