

膜乳化法与复乳法结合制备粒径均一的载溶菌酶微胶囊

黄珊珊^{1,2}, 刘荣¹, 马光辉¹, 谭天伟²

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 采用微孔膜乳化法与复乳法结合制备粒径均一可控的以聚乳酸和聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物为膜材的载溶菌酶微胶囊, 粒径分布系数 CV(Coefficient of Variation)为 14.04%, 远低于机械搅拌法制备的微囊的 CV(76.54%)。分别加入内水相添加剂 PVA, PEG400, HP- β -CD, 使溶菌酶的包埋率从无添加剂时的 68.1% 分别增大到 86.6%, 89.0% 和 94.1%。添加剂降低了溶菌酶的突释。PEG400, PEG6000, HP- β -CD 的加入降低了溶菌酶的释放速率, 而 PVP 或 PVA 的加入则加快了溶菌酶的释放。溶菌酶在油水界面上的吸附变性是失活的主要原因。在酶液中加入 PEG400, PEG6000, PVP, HP- β -CD 可有效地避免由于油水界面造成的溶菌酶活性的损失。

关键词: 膜乳化; 复乳溶剂蒸发法; 聚乳酸; 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物; 微囊

中图分类号: R944.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)04-0603-05

1 前言

采用可生物降解微胶囊对药物进行包埋后给药已成为目前的研究热点。传统的载药微囊的制备方法有相分离法^[1]、喷雾干燥法^[2]、超临界流体沉淀法^[3]、界面聚合法^[4]、复乳溶剂蒸发法^[5]等, 这些方法所制备的微囊通常粒径不均一, 往往导致微囊中药物的包埋率低、治疗靶向性差、用药效果的重现性不好、生物利用率低。Nakashima 等^[6]于 1998 年首次提出微孔膜乳化技术(Shirasu Porous Glass, SPG)用于解决食品中乳液不均一的问题。Omi 等^[7-9]和 Ma 等^[10]将该技术应用于各种微囊的制备。目前, SPG 膜乳化技术已被用于食品、化妆品、医药、农业、生化分离等领域。

采用膜乳化法制备复乳液滴存在着初乳稳定性差的问题。膜乳化法是将均质乳化得到的 W₁/O 初乳液滴在氮气的压力下通过 SPG 膜压入到外水相形成 W₁/O/W₂ 复乳。W₁/O 初乳液是热力学不稳定体系, 很容易分层导致初乳液不稳定。初乳液的不稳定将会导致在膜乳化过程中膜压不稳定, 最终将影响复乳液的粒径均一性。

常用的合成控释载体有聚乳酸(PLA)、聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)^[11]、聚酸酐(PA)^[12]等。可生物降解合成高分子 PLA 和 PLGA, 无毒, 具有良好的生物相容性, 作为可降解吸收材料被美国食品与药物管理局(FDA)批准应用于临床^[13,14]。本工作选用 PLA 和 PLGA 为膜材, 以溶菌酶作为模型药物, 拟采用膜乳化法与复乳溶剂蒸发法相结合制备粒径均一的 PLA/PLGA 载药微囊。

复乳制备过程中的剪切力和油水界面会导致蛋白质药物失活。为防止蛋白质失活, 一般采取向油相和外水相中加入稳定剂。聚乙烯醇(PVA)是外水相常用的稳定剂, 无毒、无害, 具有良好的生物相容性^[15], 本实验将其加入内水相。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为外水相添加剂能有效改善卵清蛋白在 PLGA 微囊中的包埋和释放状况^[16], 但其对活性的影响报道很少。国外有研究者将聚乙二醇(PEG)分散于油相, 采用喷雾干燥法制备微囊, 考察药物包埋与释放^[17]。有研究指出羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)能减少初乳制备中油水界面导致的蛋白质变性失活^[18,19]。本工作选取 PEG400, PEG6000, PVA, PVP, HP- β -CD 作为内水相添加剂, 考察其对微囊的包埋率和释放速率的影响, 并初步考察了其对溶菌酶的保护作用。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

聚乳酸(D,L-PLA, $M_w=300$ kDa), 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLA:PGA=75:25, $M_w=8$ kDa, 山东省医疗器械研究所), Arlacel 83(失水山梨醇倍半油酸酯, Sigma), 溶菌酶(Lysozyme, BBI), 聚乙烯醇(聚合度 1700, Kuraray), PEG6000(Biotech grade, BBI), 甲苯、二氯甲烷购自北京化学试剂公司, 其他化学试剂均为市售分析纯。

SPG 膜乳化装置(Ise Chemical Co.), 均质乳化器(北京市和莫机电研究所), 离心机(GS-6KR, Beckman), 紫外可见分光光度计(Amersham Biosciences), 场发射扫描电子显微镜(JSM-6700F, JEOL), 激光粒度仪(Coulter LS230, Coulter Co.)。

收稿日期: 2005-09-06, 修回日期: 2005-12-06

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20125616)

作者简介: 黄珊珊(1982-), 女, 河南省驻马店市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 马光辉, 通讯联系人, Tel: 010-82627072, E-mail: ghma@home.ipe.ac.cn.

2.2 微囊的制备

采用膜乳化法和复乳溶剂蒸发法制备 PLA/PLGA 载药微囊。经预实验证明,复乳时均质乳化器的转速在 9800~12000 r/min、搅拌时间在 30~70 s 时,基本不影响溶菌酶的活力。综合考虑乳化效果,复乳选择转速 10800 r/min 和搅拌时间 50 s。预实验采用甲苯/二氯甲烷为 21/79(ϕ)的混合物作为油相,减少内水相与油相的密度差,选取 Arlacel 83 作为油相乳化剂,将分子量 300 kDa 的 PLA 与分子量 8 kDa 的 PLGA 共同溶解于油相以增大油相的粘度,初乳稳定时间达 24 h。

将 5.0 mg 溶菌酶溶于 250 μ L 去离子水或含 3.0%(ω) 添加剂的水溶液中作为内水相 W_1 ,将 0.125 g PLA, 0.125 g PLGA, 0.0625 g Arlacel 83 溶于 2.5 g 甲苯/二氯甲烷混合溶剂中作为油相 O。首先,将内水相加入到油相中,以 10800 r/min 均质乳化 50 s,得到初乳液 W_1/O 。然后,在氮气压力作用下将初乳液 W_1/O 缓缓通过 SPG 膜压入到 70 mL 含 1.0% PVA 的外水相中形成粒径均一的 $W_1/O/W_2$ 复乳液滴。复乳液滴开始压出时的氮气显示压力为临界压力,临界压力取决于膜孔大小和油/水的界面张力,实际工作压力不超过临界压力的 1.1 倍。最后,将复乳液在室温下过夜搅拌,使溶剂挥发完全。将固化后的微球通过离心收集,用蒸馏水洗涤 3 次,液氮冷冻后,采用冻干机冷冻干燥 48 h 得到载药微囊产品。气相色谱分析证明最终产品中检测不出甲苯。

同时将以机械搅拌法制备的微囊与 SPG 膜乳化得到的微囊进行各项指标的对比,配方与上述相同。复乳采用均质乳化,以 10800 r/min 乳化 50 s。

2.3 微囊的表征

2.3.1 包埋率的测定

准确称取 10.0 mg 冻干微囊,加入 0.1 mol/L NaOH (含 2.0% SDS) 4.0 mL,室温下振荡 24 h,微囊完全溶解后,以 0.4 mol/L 盐酸中和。以 Peterson-Lowry 法测定其中蛋白质含量,微囊的蛋白质药物包埋率按以下公式计算:

$$\text{药物包埋率(EE)} = \frac{\text{实测溶菌酶总量}}{\text{理论微囊中溶菌酶量}} \times 100\%$$

2.3.2 体外释药的检测

准确称量 20.0 mg 冻干微囊,加入 1.5 mL PBS 缓冲液(pH=7.4),置于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器振摇(120 r/min)。定期取出 1.0 mL 上清液,离心分离,同时补入 1.0 mL 新鲜 PBS 缓冲液。以 Peterson-Lowry 法测定上清液中溶菌酶浓度。将释药累积率对时间作曲线。

2.3.3 粒径分布的测定

将冻干的微囊在蒸馏水中分散,采用激光粒度仪

Coulter LS 230 测粒径分布,以 CV 值(Coefficient of Variation)描述体积平均粒径分布:

$$CV = \left[\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{N} \right]^{1/2} / \bar{d}$$

其中 d_i 为单个微囊的粒径, \bar{d} 为体积平均粒径, N 为微囊总数。

2.3.4 微囊表面形貌

取少量冻干微囊悬浮于蒸馏水中,用吸管吸取少量滴在铝箔上,使其在铝箔上均匀摊开,自然晾干。剪下一小块铝箔用导电胶固定在样品台上,真空条件下喷金处理后,用扫描电子显微镜观察微囊的形态。

2.3.5 活性的检测

溶菌酶比酶活以水解溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)的速度测定,检测步骤为:

(1) 配制底物溶液:取 50 mg 溶壁微球菌加入 100 mL 磷酸盐缓冲液(185 mL 0.067 mol/L Na_2HPO_4 , 315 mL 0.067 mol/L KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, pH 7.0)混合搅拌 5 min。过滤后,以磷酸盐缓冲液为参比,用磷酸盐缓冲液将底物溶液在 450 nm 处的吸光度调至 0.65~0.67,记录为 E_1 。超过 1 h,底物溶液需重配。

(2) 检测:取 3.0 mL 底物溶液加入到 1 cm 比色皿中,以磷酸盐缓冲液为参比,在 450 nm 处测定吸光度。滴加 100 μ L 样品溶液,快速混合并同时计时,2 min 后读取吸光度(E_2)。

(3) 用下面的公式计算溶菌酶的比酶活,定义一个 F.I.P. 溶菌酶活力单位相当于在规定条件下于 450 nm 处使吸光度降低 0.001/min 所需的酶量:

$$\frac{E_1 - E_2}{2 \times 0.001m} = \text{F.I.P. (U/mg)}$$

式中 m 为每 10 μ L 酶液中含的酶质量(mg)。

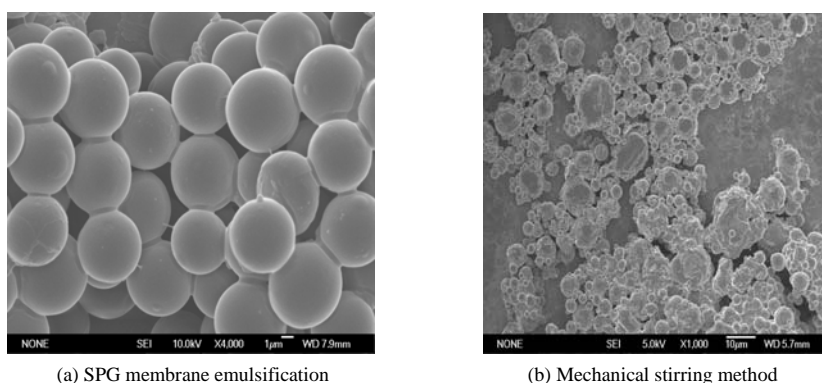
定义活性(Activity, %)=(被测酶的比活力/标准酶的比酶活力) $\times 100\%$ 来比较酶活的变化。活性=平均值 \pm 标准偏差, $n=3$ 。

3 结果与讨论

3.1 微囊表面形态及其粒径分布

分别采用膜乳化法(膜孔径 2.8 μ m)和机械搅拌法制备载溶菌酶微囊,其电镜照片如图 1 所示。采用膜乳化法制备的微囊呈圆球状,表面光滑无孔,粒径均一, CV 值为 14.04%。采用机械搅拌法制备的微囊球形粗糙,微囊粘连现象严重,粒径均一度差, CV 值为 76.54%。

在相同条件下,采用不同孔径的 SPG 膜制备出不同粒径大小的载溶菌酶微囊,并考察了微囊平均粒径与膜孔径之间的关系,结果如图 2 所示。从图可以看出,



(a) SPG membrane emulsification

(b) Mechanical stirring method

图 1 膜乳化法与机械搅拌法制备的载溶菌酶微胶囊的电镜照片

Fig.1 SEM photographs of microcapsules prepared by SPG membrane emulsification and mechanical stirring method

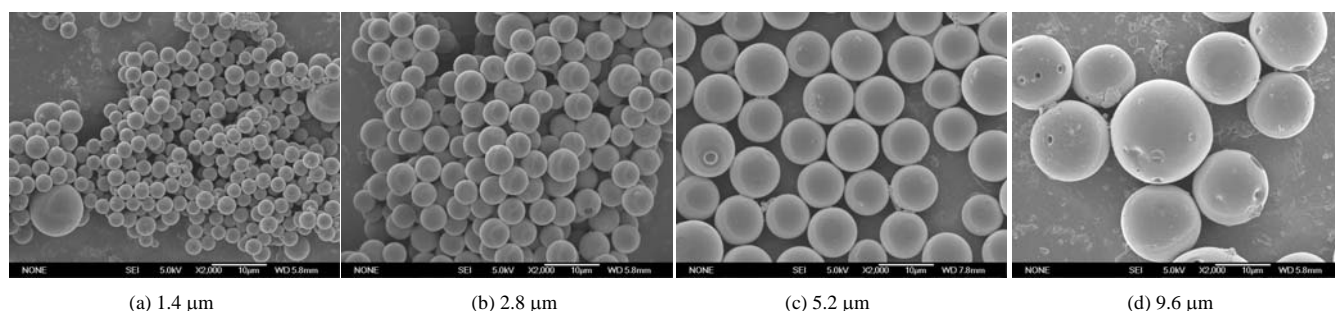
(a) 1.4 μm (b) 2.8 μm (c) 5.2 μm (d) 9.6 μm

图 2 不同孔径的 SPG 膜乳化制备的载溶菌酶微胶囊的电镜照片

Fig.2 SEM photographs of microcapsules prepared by membranes with different pore sizes

不同孔径大小的膜均可以制备粒径均一的载药微囊。

3.2 添加剂对包埋率的影响

在内水相中分别加入 3.0%(ω)的不同内水相添加剂,采用膜孔径 2.8 μm 的微孔膜制备微囊,考察微囊药物包埋率并与机械搅拌法进行了比较,结果如图 3 所示.由图可见,采用膜乳化制备的微囊的药物包埋率远远高于采用机械搅拌法制备的载药微囊的包埋率(30.1%).这是由于膜乳化制备的复乳液滴粒径均一性好,内外水相发生融合的几率减少,且复乳液滴不容易聚集、破裂,减少了药物泄漏的可能性,从而使药物的包埋率提高.当内水相中添加稳定剂后,均不同程度地提高了药物的包埋率.当添加剂为 PVA, PEG400, HP- β -CD 时,药物包埋率由无添加剂时的 68.1%分别增大到 86.6%, 89.0%和 94.1%.

加入稳定剂提高药物包埋率的因素主要有两方面:一是在内水相中药物与添加剂(HP- β -CD)可能发生氢键、疏水或其他作用,增大了药物溢出的阻力^[18];二是内水相添加剂本身为具有一定表面活性的分子(PVA, PVP)或具有两亲特性(PEG400, PEG6000),吸附在油水界面上形成了一层界面膜,抑制内外水相融合,阻碍了药物的溢出^[16,20].

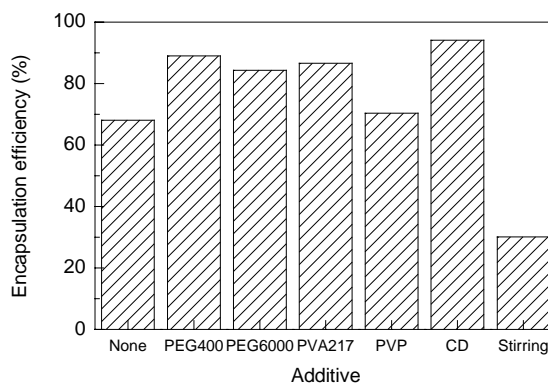


图 3 内水相添加剂对微囊包埋率的影响

Fig.3 Effect of additive to inner aqueous phase on encapsulation efficiency

3.3 添加剂对释放的影响

分别添加 3.0%(ω)的不同内水相添加剂,考察其对微囊中药物释放速率的影响.在最初释放的 24 h 内,由于微球表层的蛋白质释放,会出现突释现象.突释过大会造成血药浓度波动较大,应尽可能降低药物的突释.由图 4 可见,无添加剂的微囊第 1 天突释为 9.0%,添加剂加入不同程度降低了溶菌酶的突释,添加 PEG6000, PEG400, HP- β -CD, PVA, PVP 后的突释分别降低为 3.2%,

5.7%, 6.3%, 6.2%, 7.4%. 这可能是因为添加剂有增大药物溢出阻力和抑制内外水相融合的作用, 减少了药物在微囊表面层的吸附和不完全包埋, 从而降低了溶菌酶的突释. 与无添加剂的微囊相比, PEG400, PEG6000, HP- β -CD 的加入使溶菌酶的释放速率降低. 而 PVP 和 PVA 的加入提高了溶菌酶的释放速率, 与文献^[16]不尽一致, 原因可能是膜材中 PLA 及蛋白质性质不同.

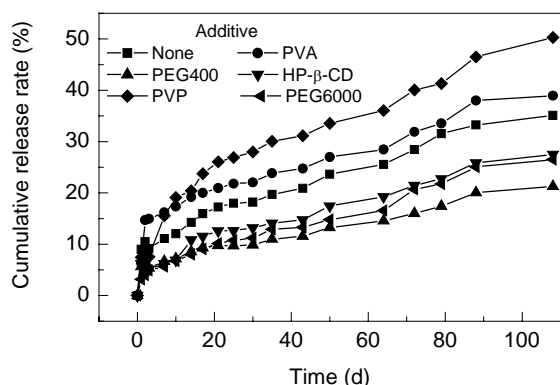


图4 内水相添加不同添加剂时的 PLA/PLGA 微囊的释放曲线
Fig.4 Cumulative release profiles of lysozyme from microcapsules prepared with different additives in inner aqueous phase

3.5 添加剂对溶菌酶活性的影响

如果蛋白质在微囊制备过程中变性, 不仅其生物活性降低, 在体内释放不完全, 还会引起免疫反应, 应尽可能避免. 本研究单独考察了添加剂对溶菌酶活性的保护作用.

将 6 mL 100 μ g/mL 的无添加剂溶菌酶溶液与含 3.0% PEG400, PEG6000, PVP, HP- β -CD 的溶菌酶溶液置于玻璃管中, 与 3 mL 甲苯/二氯甲烷混合, 在 10800 r/min 下搅拌 50 s, 静置 4 h 后油水两相分层, 取下层酶液, 再隔 4 h 取样. 测 2 次取样的活性, 计算结果见表 1. 当无添加剂时, 酶液经均质乳化器搅拌 4 h 后, 活力降低明显. 这是由于搅拌后形成细小的乳液滴, 油水相界面面积达到最大, 在以后的 4~8 h 内, 油水相分离完全, 溶菌酶与有机溶剂的接触面积减小, 溶菌酶溶液的活力降低不明显, 说明溶菌酶在油水界面上吸附变性造成失活. 蛋白质吸附于油水界面主要使蛋白表面的疏水区域暴露, 与油相作用, 导致蛋白质构象变化, 稳定蛋白中心的疏水作用减弱, 使蛋白质的热力学稳定性降低^[21].

表 1 酶液与有机溶剂接触及添加剂对溶菌酶活性的影响
Table 1 Effects of interaction between lysozyme and organic solvent, and different additives on the activity of lysozyme (%)

Time (h)	None	PEG400	PEG6000	PVP	HP- β -CD
4	43 \pm 1.6	90 \pm 3.1	96 \pm 0.8	91 \pm 0.2	96 \pm 0.3
8	41 \pm 1.6	88 \pm 0.5	95 \pm 1.0	87 \pm 0.3	95 \pm 1.9

而在水相中添加 3.0% 的 PEG400, PEG6000, PVP, HP- β -CD 可显著改善失活现象, 原因是添加剂对蛋白质的两种稳定机制: 一种是稳定剂(HP- β -CD)以各种作用(疏水作用、氢键)代替蛋白质水化层, 优先包裹蛋白质, 因而隔离与疏水界面的接触, 起到保护作用^[19]. 另一种是稳定剂分子(PVP, PEG400, PEG6000)优先吸附于油水界面, 减少了蛋白质与疏水界面的相互作用.

4 结论

(1) 向内水相添加稳定剂后, 药物的包埋率均有不同程度的提高. 内水相添加剂 PVA, PEG400, HP- β -CD 使溶菌酶的包埋率从无添加剂时的 68.1% 分别提高到 86.6%, 89.0% 和 94.1%.

(2) 添加剂的加入降低了溶菌酶的突释. 与无添加剂的微囊相比, PEG400, PEG6000, HP- β -CD 的加入降低了溶菌酶的释放速率, 而 PVP 和 PVA 的加入则加快了溶菌酶的释放.

(3) 溶菌酶在油水界面聚集变性是造成其失活的主要原因. 加入添加剂 PEG400, PEG6000, PVP, HP- β -CD 可减少油水界面造成的活性损失.

参考文献:

- [1] Chang S Z, Xiang D L, Nomizu M, et al. Preparation of DNA-loaded Polysulfone Microspheres by Liquid-Liquid Phase Separation and Its Functional Utilization [J]. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2004, 275: 470-476.
- [2] Takada S, Uda Y, Toguchi H, et al. Application of a Spray Drying Technique in the Production of TRH-containing Injectable Sustained Release Microparticles of Biodegradable Polymers [J]. *J. Pharm. Sci. Technol.*, 1995, 49: 180-184.
- [3] Ghaderi R, Artursson P, Carlfors J. Preparation of Biodegradable Microparticles Using Solution-enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) [J]. *Pharm. Res.*, 1999, 16: 676-681.
- [4] Chouinid F, Buczkowski S, Lenaerts V. Poly(alkyl-cyanoacrylate) Nanocapsules: Physicochemical Characterization and Mechanism of Formation [J]. *Pharm. Res.*, 1994, 11: 869-874.
- [5] Kim H K, Park T G. Comparative Study on Sustained Release of Human Growth Hormone from Semi-crystalline Poly(L-lactic acid) and Amorphous Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Microspheres: Morphological Effect on Protein Release [J]. *J. Controlled Release*, 2004, 98: 115-125.
- [6] Nakashima T, Shimizu M, Masato K. Membrane Emulsification by Mmicroporous Glass [J]. *Key Eng. Mater.*, 1991, 61: 513-516.
- [7] Omi S, Katami K, Taguchi T, et al. Synthesis of Uniform PMMA Microspheres Employing Mo-dified SPG (Shirasu Porous Glass) Emulsification Technique [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1995, 57: 1013-1024.
- [8] Omi S, Kaneko K, Nakayama Y, et al. Application of Porous Microspheres Prepared by SPG Emulsification as Immobilizing Carriers of Glucosylase (GluA) [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1997, 65: 2655-2664.

- [9] Omi S, Kanetaka A, Shimamori Y, et al. Magnetite (Fe_3O_4) Microspheres Prepared Using a Glass Membrane and Solvent Removal [J]. *J. Microencapsulation*, 2001, 18: 749–765.
- [10] Ma G H, Nagai M, Omi S. Preparation of Uniform Poly(lactide) Microspheres by Employing the Shirasu Porous Glass (SPG) Emulsification Technique [J]. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 1999, 153: 383–394.
- [11] Chen D R, Bei J Z, Wang S G. Polycaprolactone Microparticles and Their Biodegradation [J]. *Polym. Degrad. Stab.*, 2000, 67: 455–459.
- [12] Neeraj K, Robert S L, Abraham J D. Polyanhydrides: An Overview [J]. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2002, 54: 889–910.
- [13] Park T G. Degradation of Poly(lactide-co-glycolide acid) Microspheres: Effect of Copolymer Composition [J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 1123–1130.
- [14] Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and Evaluation in vitro and in vivo of Polylactic Acid Microspheres Containing Dibucaine [J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30: 3719–3727.
- [15] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Comparison of Body Distribution of Body Distribution of Poly(vinylalcohol) with Other Water-soluble Polymers Polymers after Intravenous Administration [J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47: 479–486.
- [16] Coombes A G A, Yeh M K, Lavelle E C, et al. The Control of Protein Release from Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microparticles by Variation of the External Aqueous Phase Surfactant in the Water-in-oil-in-water Method [J]. *J. Controlled Release*, 1998, 52: 311–320.
- [17] Blanco-Príeto M J, Besseghir K, Zerbe O. In vitro and in vivo Evaluation of a Somatostatin Analogue Released from PLGA Microspheres [J]. *J. Controlled Release*, 2000, 67: 19–28.
- [18] Kang F R, Jiang G, Hinderliter A, et al. Lysozyme Stability in Primary Emulsion for PLGA MicroSphere Preparation: Effect of Recovery Methods and Stabilizing Excipients [J]. *Pharm. Res.*, 2002, 19: 629–633.
- [19] Sah H. Stabilization of Proteins Against Methylene Chloride/Water Interface Induced Denaturation and Aggregation [J]. *J. Controlled Release*, 1999, 58: 143–151.
- [20] Harris J M. Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biochemical and Biomedical Applications [M]. New York: Plenum Press, 1992. 1–14.
- [21] Pérez C, Jesús P D, Griebenow K. Preservation of Lysozyme Structure and Function upon Encapsulation and Release from Poly(lactide-co-glycolic) Acid Microspheres Prepared by the Water-in-oil-in-water Method [J]. *Int. J. Pharm.*, 2002, 248: 193–206.

Preparation of Uniform-sized PLA/PLGA Microcapsules Containing Lysozyme by Combining Porous Glass Membrane Emulsification and Multiple Emulsion-solvent Evaporation

HUANG Shan-shan^{1,2}, LIU Rong¹, MA Guang-hui¹, TAN Tian-wei²

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
2. School of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Relatively uniform-sized biodegradable poly(lactide) (PLA) and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microcapsules containing lysozyme were successfully prepared by combining porous glass membrane emulsification technique with multiple emulsion-solvent evaporation method. Compared with the stirring method, it was found that the sizes of microcapsules are more uniform, the coefficient of variation (CV) value which indicates the size distribution was 14.04%. It was found that adding additives to inner aqueous phase could efficiently improve the drug encapsulation efficiency, adjust the drug release profile and maintain the bioactivity of drug. When PVA, PEG400 and HP- β -CD were separately added into the inner aqueous phase, the encapsulation efficiency increased from 68.1% to 86.6%, 89.0% and 94.1% respectively. The cumulative release amount was decreased when PEG400, PEG6000, HP- β -CD were added. While it was enhanced when PVP or PVA was added. It demonstrated that the main reason for protein deactivation was lysozyme adsorption onto the W_1/O interface. The loss of lysozyme activity was successfully prevented by adding PEG400, PEG6000, HP- β -CD or PVP into the inner aqueous phase.

Key words: porous glass membrane emulsification; multiple emulsion-solvent evaporation; PLA; PLGA; microcapsules