

DOI: 10.3969/j.issn.1007-9580.2018.05.009

低场核磁共振技术在鱼用冻干疫苗保护剂筛选中的应用

陈 晖^{1,2,3}, 陈思谨^{2,3}, 洪碧红^{2,3}, 彭 会¹, 洪 专^{2,3}, 易瑞灶^{2,3}

(1 厦门大学环境与生态学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

2 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

3 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361005)

摘要:为筛选适合鱼类冻干疫苗中使用的保护剂,采用低场核磁共振技术(LF-NMR)对冻干后不同保护剂中的水分分布和迁移规律进行了分析。根据水中氢质子的弛豫时间,可将保护剂中的残留水分分为结合水、不易移动水和自由水3种形态。结果显示:冷冻干燥过程中二次干燥温度对甘露醇和蔗糖中残留水的分布有较大影响,随着温度从4℃升高到37℃,大部分自由水解吸而小部分转化为结合水。当冻干后的样品暴露在相对湿度43%和温度25℃的环境中时,大部分保护剂吸收水分,并将其固定为结合水,而甘露醇中的部分结合水则转变为自由水,并解吸到环境中。不同冻干保护剂中的水分分布和迁移并不相同,代表其具有不同的水分结合能力。该研究结果有助于鱼用冻干疫苗中保护剂的筛选和冻干工艺的优化,以便获得更加稳定的疫苗产品。

关键词:低场核磁共振; 鱼用疫苗; 冻干疫苗; 冻干保护剂

中图分类号: R944.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-9580(2018)05-051-06

作为鱼病防治最有效的方式,疫苗的使用避免了目前广泛使用的化学药物或者抗生素造成的环境问题和健康问题,可以更加安全有效地预防水产养殖鱼类传染性病害的发生^[1-2]。活性疫苗大多对热敏感,通常采用冷冻干燥的方式进行干燥。糖及其衍生物能够维持冻干蛋白制剂的稳定,防止蛋白质失活和变性^[11-12],是冻干过程中常用的保护剂。近年来的研究表明,糖及其衍生物的保护作用与其较强的水分结合能力密切相关。水是引起药物制剂不稳定的重要因素之一,高水分含量会加速蛋白质变性。制剂中的水分可分为结合水、不易移动的水和自由水^[8,10],而影响药物稳定的主要是自由水。因此,在冷冻干燥过程中应当筛选合适的保护剂,尽量减少自由水的含量^[6]。低场核磁共振(LF-NMR)作为一种水分测定的新技术,基于甲氢(H)质子核磁性质的不同而能够区分不同状态的水^[15]。这种方法快速、无损、无创、预处理少,越来越广泛地应用于牛肉、

水果、面包等食品中或保水剂中水分状态和分布的研究^[13,16-19],但将其应用于冻干保护剂的筛选尚未见报道。

本研究旨在比较不同冻干保护剂中水分的状态及其分布,进而比较其水分结合能力,以期了解其与水的相互作用,通过选择合适冻干保护剂或优化冻干工艺参数,获得更稳定的冻干疫苗产品。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

无水蔗糖、乳糖、右旋糖酐40、甘露醇和二水合海藻糖均购于Sigma公司(中国)。冷冻干燥机, Lyobeta25(西班牙 Telstar 公司); 金属浴, OSE-H(中国天根公司); X射线衍射仪, Smartlab 3KW(日本 Rigaku 公司); 卡氏水分测定仪, 890 Titrand(瑞士 Metrohm 公司); 低场核磁共振(LF-NMR)分析仪, PQ01(中国苏州纽迈公司); 药物

收稿日期: 2018-07-27

基金项目: 厦门海洋高技术产业基地创新创业共享服务平台项目(16PFW008SF15); 福建省高职院校海洋生物应用技术协同创新中心(2017); “十三五”北海市海洋经济创新发展示范项目(Bhsfs003, Bhsfs009); 2010海洋公益行业科研专项(201005020-1)

作者简介: 陈晖(1980—),男,助理研究员,硕士,研究方向:生物化学。E-mail: chenhui@tio.org.cn

通信作者: 易瑞灶(1952—),男,研究员,本科,研究方向:天然产物化学。E-mail: yiruizao@163.com

稳定性试验箱 JCH 260(德国 MeMelt 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备

用高纯水配制成质量体积比为 10% 的样品,采用 15 mL 冻干瓶,每瓶装样 4 mL,溶液的高度约为 1 cm。预冻:搁板以 2 °C/min 的速率降温至 -40 °C,保持 2 h;主干燥:真空度为 0.2 mbar, -10 °C 下干燥 6 h;二次干燥:温度为 37 °C 或 4 °C,干燥 4 h;各干燥步骤之间加热速率为 0.2 °C/min。冻干结束后,样品立即密封,室温保存。样品测定之前用 40 °C 金属浴快速加热,开封后立即进行测量。

1.2.2 晶型分析

使用 CuK α_1 靶,波长 $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ 塑胶平板放置样品,5°~80°连续扫描,步进 0.02°,分析时长 8 min,采用 D/Tex 一维高速探测器在室温下进行试验,收集数据。

1.2.3 水分含量测定

精密称取 0.5 g 冻干样品,搅碎后立即加入滴定器中。以 10 mg 超纯水为校准液,利用 TIAMO 2.3 软件自动计算数据。

1.2.4 水分分布分析

精密称取 1 g 冻干样品,搅碎后放入直径为 2.5 cm、高度为 30 cm 的玻璃管中,确保样品的高度不超过 2 cm,然后将管子插入 LF-NMR 分析仪中。采用 CPMG 序列测量样品横向弛豫时间 T_2 。CPMG 参数如下:谱宽(SW) 200 kHz、回波时间(TE) 0.08 ms;脉冲宽度 90(P1)和 180(P2)分别为 4.48 和 10.48 μ s;等待时间(TW) 10 000 ms;射频延迟时间(RFD) 0.1 ms;模拟增益(RG1) 20 db;数字增益(DRG1) 3。在 32 °C 下进行 128 次重复扫描,获得 500 个回波的数据。采用 MUXEXP 分析软件进行分析^[15 20]。

1.2.5 吸湿性测试

精密称取 1 g 冻干样品,置于药物稳定性试验箱中,设定温度(25 ± 2) °C,相对湿度为(43 ± 5)%,每 12 h 称重,直至质量稳定,以稳定后的样品质量计算吸水率,计算公式如下:

$$X = 100\% \times (M_2 - M_1) / M_1 \quad (1)$$

式中: X—吸水率; M_1 —放置前样品质量, g; M_2 —放置后样品质量, g。

2 结果与讨论

2.1 冻干保护剂中的水分含量

在冷冻干燥过程中,最终产物的水分含量与二次干燥温度密切相关,温度越高,含水量越低^[6]。考虑到 4 °C 和 37 °C 分别为一般冻干制品二次干燥的温度的下限和上限,为了获得水分含量差异较大的样品,选择了这两个温度作为不同的二次干燥温度。从图 1 中可以看出,样品中的水分含量随着二次干燥温度的升高而减少,相同温度下甘露醇的含水量低于其它糖类。通过设定不同的二次干燥温度,能够获得不同含水量的冻干样品。

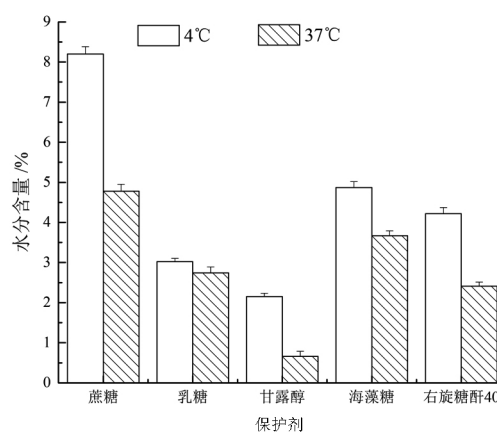


图 1 不同二次干燥温度下冻干保护剂中的水分含量

Fig. 1 Water content of freeze-drying protective agents at different secondary drying temperature

2.2 冻干保护剂的晶型分析

X 射线粉末衍射(XRPD)是最直接的形态学分析方法。根据布拉格衍射方程,当衍射发生时,两个晶面($2d\sin\theta$)的光程差应该是波长(λ)的整数倍。通过将 X 射线相对衍射强度(I/I_0)与衍射角 2θ 作图,可以得到样品的物理形态和结晶度等结构数据。采用这一方法,对在 4 °C 下干燥的保护剂样品形态进行了分析。图 2 可见,在衍射角连续变化过程中,冻干海藻糖、蔗糖、乳糖和右旋糖酐均表现出弥散峰,没有明显的衍射峰,表明其中没有晶体结构。而甘露醇具有明显的衍射峰,表明冷冻干燥后甘露醇为晶态,其出峰时间对应的衍射角中包含 9.6°、16.5°、18°、25.7° 等角度,

与半水合甘露醇的典型衍射角相吻合^[21],表明其中存在半水合甘露醇。此外,冻干甘露醇在衍射角 14.6° 和 16.8° 处也有出峰,表明其中还含有 β -多晶型物^[21]。这一推论也与其实际含水率(2.5%)明显低于半水合甘露醇理论含水率(4.71%)的结果相吻合。

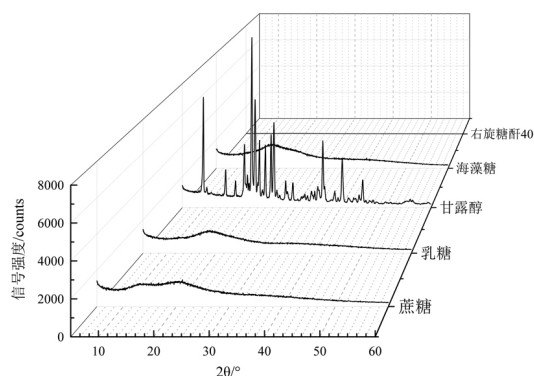


图2 X射线粉末衍射分析冻干保护剂的晶型

Fig. 2 Analysis of polymorph of freeze-drying protective agents by XRPD

2.3 冻干保护剂中的水分分布

采用 LF-NMR 的方法对冻干保护剂中的水分分布进行分析,结果如图 3 所示。水分子中氢质

子的 T_2 (横向) 弛豫时间表示了水分子的状态及周围的物理化学环境^[22]。在之前冻干大豆抗氧化肽的研究中^[15],根据 LF-NMR 测得的弛豫时间,其中的水被分为强结合水、弱结合水、不易移动水和自由水四种状态,其中最后两种状态的水分子具有高度的自由度。

图 3 所示,二水合海藻糖(Tre-di)中只有一种形态的水,其弛豫时间 $T_{21} < 1$ ms。考虑到二水合海藻糖中结晶水分子与海藻糖分子紧密结合的性质,可以认为这一形态的水属于结合水,参考之前的研究^[15,17,23]将 1 ms 作为结合水 T_2 弛豫时间的上限。

当二次干燥温度为 4°C 时,冻干蔗糖和甘露醇中均出现了两种形态的水。在甘露醇中,其弛豫时间 T_{22} 和 T_{23} 分别约为 3.2 ms 和 24.5 ms;在蔗糖中,其弛豫时间约为 3 ~ 100 ms。在之前的研究中^[15,17,23], T_2 弛豫时间 > 10 ms 的水被认为是自由水,在 1 ms 和 10 ms 之间是不易移动水。由图可见,在二次干燥温度为 4°C 时,冻干甘露醇和蔗糖中不仅存在结合水,而且还存在不易移动水和自由水,其中蔗糖中结合水约占总水分含量的 5.69%,甘露醇中这一比例为 8.67%,在这两种糖中结合水的比例远小于不易移动水和自由水。

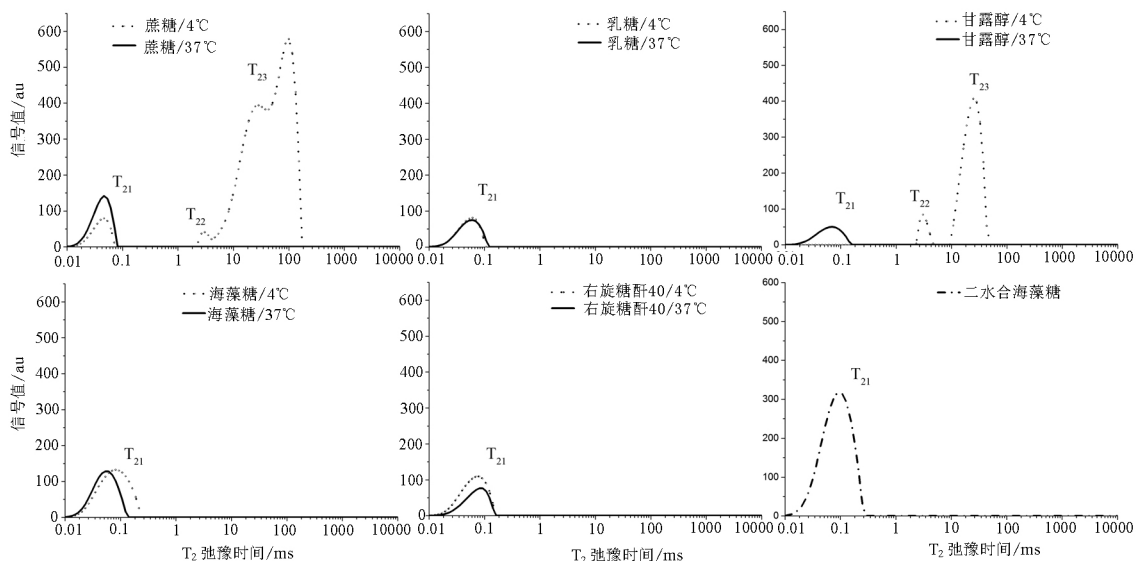


图3 LF-NMR 分析不同二次干燥温度下冻干保护剂中的水分分布

Fig. 3 Analysis of water distribution in freeze-drying protective agents at different secondary drying temperature by LF-NMR

当二次干燥温度为 37 °C 时,所有冻干样品中仅存在一种形态的水,即弛豫时间小于 1 ms 的结合水。与 4 °C 的干燥条件相比,蔗糖和甘露醇中结合水的峰面积变大,表明甘露醇和蔗糖中的部分水分随着二次干燥温度的升高发生了迁移。在这一过程中,不仅自由水解吸,而且一些自由水转变为结合水。通常认为在二次干燥过程中,随着干燥温度和真空度的增加,水分将从结合水转变成自由水^[6],而在本试验中,甘露醇和蔗糖中的水分迁移规律正好相反。对于海藻糖、乳糖和葡聚糖,即使在 4 °C 的二次干燥温度下,冻干样品中也仅有结合水残留,二次干燥温度的增加对最终产品水分分布的影响不大。这一结果表明,海藻糖、乳糖和右旋糖酐 40 对水的结合能力较强,甘露醇、蔗糖对水的结合能力较弱。

2.4 冻干保护剂的吸湿性

吸湿性反映了样品对水分的结合能力。测试了二次干燥温度为 37 °C 的各种冻干保护剂的吸湿性,结果见表 1。除甘露醇外,所有糖均具有吸湿性,蔗糖的吸水率最低(1.88%),明显低于其他保护剂(4.53%~8.54%),而甘露醇则表现出失水性。

表 1 二次干燥温度为 37 °C 的冻干保护剂吸湿性
Tab. 1 Hygroscopicity of freeze-drying protective agents at a secondary drying temperature of 37 °C

项目	吸水率/%
蔗糖	1.88 ± 0.23
乳糖	4.53 ± 0.32
甘露醇	-0.60 ± 0.11
海藻糖	5.89 ± 0.47
右旋糖酐 40	8.54 ± 0.65

为了深入了解吸收的水分与保护剂之间的相互作用,采用 LF-NMR 测定了吸湿后冻干保护剂中的水分分布,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,除甘露醇外的各冻干保护剂能够牢固地结合吸收的水分,形成结合水。结合水的增加量与吸湿量相一致。糖类吸水能力的强弱在很大程度上取决于其极性基团的分布及其对水的可接近性,水-水以及水-大分子之间相互作用的强度,甚至基质的结晶度和相对湿度^[23]。在本研究中,右旋糖酐 40 表现出最强的吸湿性,意味着其具有最强的水分结合的能力,而在二糖中,海藻糖和乳

糖的结合能力比蔗糖强,其原因可能与糖类分子结构有关。

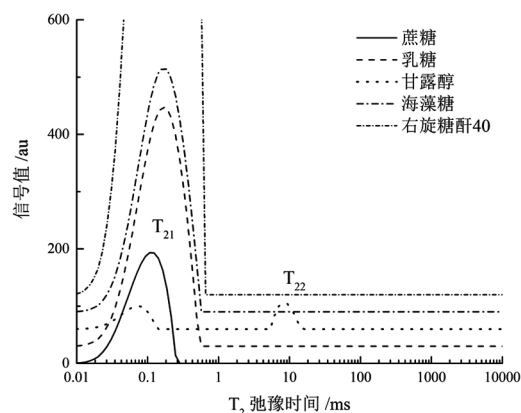


图 4 冻干保护剂吸收的水分布

Fig. 4 Distribution of water absorbed by freeze-drying protective agents

半水甘露醇在室温下有很强的失水倾向性^[21]。在 T_2 弛豫时间曲线中,表示结合水的 T_{21} 面积减小,出现了代表自由水的 T_{22} ,大约占总信号的 40%。这意味着在这一环境中,半水甘露醇中的残留水从结合水转变为自由水,随后部分蒸发到环境中。

水分含量是影响药物稳定性的重要因素之一,它会引起药物活性下降或者降解,影响最终药品的疗效^[24-25],因此在干燥过程中控制水分的残留量对于维持其稳定性至关重要,特别是对于干燥条件温和的冻干样品来说更是如此^[6, 26]。然而,在众多冻干保护剂对于蛋白类药物如 HI-6 载药白蛋白纳米粒^[24],人表皮生长因子(rhEGF)^[27],酸性磷酸酶等^[6]稳定作用的报道中,海藻糖的效果优于甘露醇,即便其制剂中含水量高于甘露醇。这意味着冻干保护剂不仅是通过限制残余水分,更重要的是限制水分的活动性,从而发挥其保护作用。受限于传统的水分分析方法如干燥失重法或卡氏水分测定法等只能测定样品中的水分含量而无法判断样品与水分的结合能力强弱。

本研究采用食品领域中逐渐得到应用的 LF-NMR 技术来测定冻干保护剂中的水分分布,进而判断其水分结合能力。结果显示,不论二次干燥的温度是 4 °C 或 37 °C,在冻干海藻糖、乳糖和右旋糖酐中都没有自由水,说明其对水具有很强的结合能力,进而表现出强烈的吸湿性。而对

于蔗糖和甘露醇,水分结合能力相对较低,表现在4℃或37℃的二次干燥温度下进行干燥后,水分分布有明显的不同。正是因为甘露醇无法牢固的结合制剂中的水分,所以制剂中总水分含量虽然低,但是其中存在有自由水,或者是存储过程部分结合水转变为自由水,从而加速了药物的降解。因此含有甘露醇的药物制剂稳定性不如海藻糖或右旋糖酐。这一结果也说明,含有蔗糖和甘露醇的药物制剂在冷冻干燥过程中需要对干燥工艺特别是二次干燥温度进行细致的研究,以便使其中的自由水能够最大限度地解析出来,延长制剂稳定性。不同保护剂对水分结合能力的差别,可能与其在冻干后形成的物理结构有关^[7-28]。对于甘露醇,冻干后形成的晶体结构导致其与晶体外的水之间具有较弱的结合力,而对于其他糖和葡聚糖,冻干后形成的无定形态使水溶解在其内,从而使其与水具有更强的结合力。

3 结论

冻干保护剂中存在3种不同形态的水分,采用LF-NMR的方法分别确认了这3种形态水的弛豫时间:1ms以内为结合水,1~10ms为不易移动水,10ms以上为自由水。二次干燥温度对甘露醇和蔗糖中残留水分的分布有很大影响,随着温度的升高,自由水的含量减少。由于甘露醇半水合物存在,冻干甘露醇表现出强烈的失水倾向,当暴露在相对湿度43%、温度25℃的环境中时,其部分残留水分从结合水转变为自由水,然后蒸发到环境中,而其他非晶态冻干保护剂吸收环境中的水并将其固定到结合水中。通过对常见冻干保护剂中水分分布的研究,对其水分结合能力有了更深入的了解,有助于更好地了解冻干保护剂对药物的保护作用,在制剂配方中筛选合适的保护剂并优化冻干工艺以获得更稳定的药物制剂。

致谢:感谢苏州纽迈分析仪器股份有限公司、日本理学公司广州办事处提供仪器和技术上的帮助。 □

参考文献

- [1] 刘帅,卢彤岩,李绍成. 冷水性鱼类疫苗研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2017(1): 74-79.
- [2] 园园叶,星田. 鱼用基因工程疫苗研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(5): 145-152.

- [3] 谭长江,孟宇航. 兽用疫苗耐热冻干保护剂的研究进展[J]. 中国畜禽种业, 2011(6): 16-18.
- [4] MORAIS A R D V, ALENCARÉ N, XAVIER J, NIOR F H, et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 503(1/2): 102-114.
- [5] ERMOLINA I, SMITH G. Dielectric spectroscopy of low-losses sugar lyophiles: III The influence of moisture on the dielectric response of freeze-dried lactose [J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011, 357(2): 671-676.
- [6] PISANO R, RASSETTO V, BARRESI A A, et al. Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, 85(3): 974-983.
- [7] DE OLIVEIRA ALVES C C, DE RESENDE J V, PRADO M E T, et al. The effects of added sugars and alcohols on the induction of crystallization and the stability of the freeze-dried peki (Caryocar brasiliense Camb.) fruit pulps [J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(6): 934-941.
- [8] HARNKARNSUJARIT N, CHAROENREIN S. Effect of water activity on sugar crystallization and β -carotene stability of freeze-dried mango powder [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 105(4): 592-598.
- [9] RODRÍGUEZ-BERNAL J M, FLORES-ANDRADE E, LIZARAZO-MORALES C, et al. Moisture adsorption isotherms of the borjój fruit (Borojoa patinoi. Cuatrecasas) and gum arabic powders [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 94: 187-198.
- [10] ZHU B, DONG X, ZHOU D, et al. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber Stichopus japonicus [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 182-188.
- [11] OHTAKE S, SHALAEV E. Effect of water on the chemical stability of amorphous pharmaceuticals: I. Small molecules [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 102(4): 1139-1154.
- [12] MUNJAL B, BANSAL A K. Counter-intuitive effect of non-crystallizing sugars on the crystallization of gemcitabine HCl in frozen solutions [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 478(1): 46-52.
- [13] DING X, ZHANG H, WANG L, et al. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47: 32-40.
- [14] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Survival of Bifidobacterium longum 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying [J]. Food Research International, 2013, 51(2): 503-509.
- [15] LIN S, YANG S, LI X, et al. Dynamics of water mobility and distribution in soybean antioxidant peptide powders monitored by LF-NMR [J]. Food Chemistry, 2016, 199: 280-286.
- [16] LI T, RUI X, LI W, et al. Water distribution in Tofu and application of T_2 relaxation measurements in determination of Tofu's water-holding capacity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(34): 8594-8601.
- [17] LI X, MA L Z, TAO Y, et al. Low Field-NMR in measuring water mobility and distribution in beef granules during drying process [J]. Advanced Materials Research, 2012, 550-553: 3406-3410.

- [18] AGUDELO-LAVERDE L M ,SCHEBOR C ,BUERA M D P. Water content effect on the chromatic attributes of dehydrated strawberries during storage ,as evaluated by image analysis [J]. LWT -Food Science and Technology 2013 52(2) : 157-162.
- [19] 关志强 ,马超锋 ,李敏 等. 基于低场核磁共振优化的罗非鱼片无磷保水剂及其配方研究 [J]. 渔业现代化 2018 45(2) : 64-72.
- [20] LI T RUI X ,WANG K et al. Study of the dynamic states of water and effects of high-pressure homogenization on water distribution in tofu by using low-field nuclear magnetic resonance [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2015 30: 61-68.
- [21] NUNES C ,SURYANARAYANAN R ,BOTEZ C E , et al. Characterization and crystal structure of D-mannitol hemihydrate [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences ,2004 , 93(11) : 2800-2809.
- [22] BERMAN P ,MEIRI N ,LINDER C ,et al. ¹H low field nuclear magnetic resonance relaxometry for probing biodiesel autoxidation [J]. Fuel 2016 177: 315-325.
- [23] WANG P ,XU L ,NIKOO M et al. Effect of frozen storage on the conformational ,thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin-and gliadin-rich fractions [J]. Food Hydrocolloids 2014 35: 238-246.
- [24] DADPARVAR M ,WAGNER S ,WIEN S et al. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2014 88(2) : 510-517.
- [25] SZAKONYI G ,ZELK R. Water content determination of superdisintegrants by means of ATR-FTIR spectroscopy [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis ,2012 ,63: 106-111.
- [26] SETTE P ,SALVATORI D ,SCHEBOR C. Physical and mechanical properties of raspberries subjected to osmotic dehydration and further dehydration by air-and freeze-drying [J]. Food and Bioproducts Processing 2016 100: 156-171.
- [27] SANTANA H ,SOTOLONGO J ,GONZÁLEZ Y , et al. Stabilization of a recombinant human epidermal growth factor parenteral formulation through freeze-drying [J]. Biologicals , 2014 42(6) : 322-333.
- [28] JENA S ,SURYANARAYANAN R ,AKSAN A. Mutual influence of mannitol and trehalose on crystallization behavior in frozen solutions [J]. Pharmaceutical Research , 2016 , 33 (6) : 1413-1425.

Application of low field NMR technology to screening of protective agents of freeze-dried fish vaccines

CHEN Hui^{1,2,3} ,CHEN Sijin^{2,3} ,HONG Bihong^{2,3} ,PENG Hui¹ ,HONG Zhuan^{2,3} ,YI Ruizao^{2,3}

(1 School of Environment and Ecology ,State Key Laboratory of Marine Environmental Science , Xiamen University ,Xiamen 361005 ,Fujian ,China;
2 Third Institute of Oceanography ,State Oceanic Administration ,Xiamen 361005 ,Fujian ,China;
3 Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources ,Xiamen 361005 ,Fujian ,China)

Abstract: To screen protective agents suitable for freeze-dried fish vaccines ,low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) was applied to analyze the water distribution and mobility in different protective agents after freeze drying. According to the relaxation time of hydrogen protons ,resident water can be divided into three states: bound water ,immobilized water and free water. Results showed that secondary drying temperature had a great impact on the water distribution in mannitol and sucrose ,and with the increase of temperature from 4 °C to 37 °C ,most free water desorbed and some shifted to bound water. When placed in environment with relative humidity of 43% and temperature of 25 °C ,most protective agents absorbed water and immobilized it to bound water ,except that some bound water in mannitol shifted to free water which desorbed to the environment. Water distribution and mobility in different freeze-drying protective agents were not the same ,which indicated their different ability in water binding. This research would be helpful for screening of protective agents of freeze-dried fish vaccines and optimization of freeze-drying process ,to form a more stable vaccine product.

Key words: low field NMR(LF -NMR) ; fish vaccine; freeze-dried vaccine; freeze-drying protective agent