

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01457

## 基于长春西汀酸的荧光偏振免疫方法测定磺胺二甲氧基嘧啶

王小勇<sup>1</sup> 龚福春<sup>\* 1 3</sup> 唐连飞<sup>2</sup> 李治章<sup>1</sup> 郑兴良<sup>3</sup> 湛雪辉<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( 湖南科技学院化学与生物系, 永州 425100) <sup>2</sup>( 湖南省出入境检验检疫局, 长沙 410004)

<sup>3</sup>( 长沙理工大学化学与生物工程学院, 长沙 410004)

**摘要** 合成了荧光标记物长春西汀酸和示踪物磺胺二甲氧基嘧啶-长春胺酸, 并采用薄层色谱法对示踪物进行提纯。以磺胺二甲氧基嘧啶为分析对象, 利用示踪物与磺胺二甲氧基嘧啶抗体的特异性反应, 采用荧光偏振免疫分析方法( FPIA) 研究了荧光标记物的荧光光谱特性。此荧光标记物在 357 nm 的激发光下, 于 453 nm 处产生一个荧光发射峰; 以荧光素为对照, 考察了本方法的灵敏性。结果显示, 荧光素的检出限仅为 2.7 μg/L, 而本方法的检测范围为 0.5 ~ 146 μg/L, 检出限达到 0.5 μg/L。本方法的 RSD 为 3.0%, 重现性好; 其它磺胺类药物对磺胺二甲氧基嘧啶的测定不产生明显干扰。运用本方法检测了饲料中磺胺二甲氧基嘧啶, 结果与 HPLC 法相吻合。

**关键词** 荧光偏振免疫分析; 荧光标记物; 长春西汀酸; 磺胺二甲氧基嘧啶

### 1 引言

免疫分析技术是建立在抗原-抗体特异性反应基础上的生物化学分析方法。该方法利用了抗原抗体反应特异性高和亲和性好的特点, 可以达到从极其复杂组分中特异性识别待测物并灵敏检测之目的。酶联免疫吸附分析( Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 具有高灵敏度、高效率 and 低成本的优势, 因而获得了广泛应用<sup>[1-5]</sup>。但是, ELISA 作为一种非均相免疫检测方法, 它涉及多步反应、分离和洗涤步骤, 操作繁琐<sup>[6]</sup>。因此, 建立高灵敏、简便和快速的均相免疫分析方法已成为免疫检测的发展趋势。

荧光偏振免疫分析( Fluorescence polarization immunoassay, FPIA) 是一种均相免疫检测方法, 与其它非均相免疫方法相比, 具有简便、快速、易于自动化、样品用量少、精密度高、准确等优点<sup>[7]</sup>。因此, FPIA 法在药物、激素和毒素等小分子半抗原的检测中展示了良好的应用前景<sup>[7-11]</sup>。FPIA 法通过检测荧光标记抗原( 示踪物) 在结合特异性抗体前后的荧光偏振强度( Fluorescence polarization, FP) 变化, 测定待测半抗原<sup>[12]</sup>。

荧光示踪剂是 FPIA 法的关键试剂。由于荧光素及其衍生物具有消光系数高、激发/发射波长均在可见光区、在水中的荧光量子产率高、无毒、易与识别分子交联、成本低等优点, 常作为荧光标记物用于标记抗体/抗原, 或用于 FPIA 法中标记半抗原制备示踪剂。但是, 荧光素及其衍生物存在一些不足: Stoke 位移小, 样品背景对荧光的干扰较大<sup>[13]</sup>; 荧光量子产率对 pH 值敏感, 且在生物体内的生理环境下荧光量子产率降低<sup>[14]</sup>; 具有对光敏感的酚羟基, 在强光检测下容易分解<sup>[15]</sup>; 亲脂性差, 不宜渗入细胞, 因而用于细胞的研究效果差; 特异选择性差。

长春胺是一种治疗老人痴呆症生物碱类药物, 具有平面刚性结构, 是一个较好的荧光发射体。长春胺为天然产物, 对人体无毒副作用, 还具有荧光量子产率高, 在溶液中稳定等性质<sup>[16]</sup>。本研究以长春胺为原料, 经过简单反应合成了具有 —COOH 活性基团的长春西汀酸( AVA, 结构见图 1), 使之易于与其它化合物交联; 以磺胺二甲氧基嘧啶为分析模型, 利用新荧光剂作标记物制备了示踪物, 并建立了磺胺二甲氧基嘧啶( Sulfadimethoxine, SMX) 荧光偏振免疫分析方法。对新型荧光标记物的荧光光谱特性和示踪物免疫反应性能进行了研究; 通过与基于荧光素标记物的 FPIA 法比较, 基于新荧光标记物的荧光偏振免疫分析方法灵敏度提高。

2010-01-20 收稿; 2010-06-04 接受

本文系湖南省科技计划( Nos. 2009FJ4061, 2009CK3069) 资助项目

\* Email: gfc139@yahoo.com.cn

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

荧光偏振测定在 Wallac VICTOR<sup>3</sup>1420 多标记分析仪(美国 PE 公司)上进行;EMS-5 水浴控温磁力搅拌器(金坛市希望科研仪器有限公司)用于控制免疫反应温度。长春胺、5-氨基荧光素(5-Aminofluorescein, AF)、*N,N'*-二环己基碳二亚胺(*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC)和 *N*-羟基琥珀酰(*N*-Hydroxysuccinimide, NHS, 美国 Sigma 公司);磺胺二甲氧基嘧啶(Sulfadimethoxine, SMX)及其它试剂均为分析纯(上海试剂公司);磺胺二甲氧基嘧啶抗体(北京望尔生物技术有限公司);硼酸盐缓冲液(BB 溶液, 50 mmol/L, pH 8)作为稀释液用于所有样品稀释。

### 2.2 荧光标记物长春胺酸的合成

称取 2 g 长春胺,加热下溶解在含 0.82 g NaOH 的 25 mL 乙醇中,回流反应 6 h,冷却后,用冰醋酸调节到中性。溶液在 0~4 °C 下结晶,过滤得长春胺酸(14,15-二氢-14-羟基象牙烯-14-羧酸)。取长春胺酸 1 g 溶解在 40 mL CHCl<sub>3</sub>和 5 mL 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 组成的混合物中,回流 8 h。反应结束后,冷却,用 10% NaOH 调节至 pH 8.5,减压蒸发到 5 mL,冷却后,在剩余物中加入 50 mL 乙醇,混合溶解,放置在 0~4 °C 下结晶,得长春西汀酸(Apovincaminic acid, AVA) 0.82 g,收率 82%。结构鉴定为:mp 119~120 °C (MeOH), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +36 (c 1, CHCl<sub>3</sub>)。IR (cm<sup>-1</sup>): 3417, 2934, 1731, 1650, 1438, 1264, 1193, 1086, 745; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, δ<sub>TMS</sub> = 0.00 ppm): 0.51 (1H, dq, H<sub>x</sub>-20), 0.71 (3H, t, H<sub>3</sub>-21), 1.42 (1H, dq, H<sub>y</sub>-20), 1.89 (1H, m, H<sub>ax</sub>-17), 2.15 (1H, m, H<sub>eq</sub>-17), 2.51 (1H, ddd, H<sub>ax</sub>-18), 2.63 (1H, dd, H<sub>eq</sub>-18), 2.78~2.86 (2H, m, H<sub>2</sub>-6), 3.10 (1H, m, H<sub>ax</sub>-5), 3.97 (3H, s, OMe), 4.52 (1H, s, H-3); 4.98 (1H, m, H<sub>eq</sub>-5), 6.38 (1H, s, H-15), 7.16~7.23 (2H, m, H-10, H-11), 7.33 (1H, m, H-12); 7.48 (1H, m, H-9); MS (ESI, CID = 20%) *m/z* (rel. int. %): 381([M+H]<sup>+</sup>, 100), 363(5), 352(8), 337(53), 319(96), 291(28), 270(33), 208(91)。

### 2.3 长春西汀酸-磺胺二甲氧基嘧啶和荧光素-磺胺二甲氧基嘧啶示踪物的合成

长春西汀酸-磺胺二甲氧基嘧啶(AVA-SMX)的合成参考文献[17]进行。将 25 mg AVA 溶于 50 mL DMF 中,加入 18 mg DCC 和 13 mg NHS,搅拌直至白色粉末完全溶解,室温下暗处过夜。取 10 mL 上清液,在其中加入 8 mg SMX,室温搅拌反应 2~3 h。然后取反应液的小部分(约 50 μL)用硅胶-60 的 TLC 板分离,以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲醇(4:2:1, V/V)为展开剂。刮下比移值 *R<sub>f</sub>* 为 0.27 的蓝色荧光处条带,用 1 mL 乙醇提取,得示踪物 AVA-SMX 液体,置 4 °C 下保存备用。

氨基荧光素-磺胺二甲氧基嘧啶(AF-SD)的合成:将 30.0 mg SMX,16.50 mg DCC 和 10.3 mg NHS 溶于 1 mL DMF 中,室温下搅拌反应过夜,离心去除沉淀后,在所得上清液中加入 3.6 mg 5-氨基荧光素(AF),室温下避光搅拌反应过夜,产物用薄层层析硅胶板分离,展开剂为三氯甲烷-甲醇(4:0.5, V/V)。将 *R<sub>f</sub>* = 0.23 处的黄色带产物用 1 mL 乙醇提取,所得提取物置于 4 °C 下保存备用。

### 2.4 荧光示踪物鉴定与浓度测定

取上述 2 种荧光示踪物各 1 mL,分别与稀释 1000 倍的 1 mL SMX 抗体混合,室温培育 5 min 后,测定荧光偏振值(Fluorescence polarization, FP)的变化。分别测定游离示踪物、示踪物与稀释 1000 倍抗血清结合后的 FP 值,通过比较游离示踪物与结合特异性抗体后 FP 值的变化来鉴定示踪物活性。通过与 Wallac-VICTOR<sup>3</sup>1420 多标记分析仪相连的 FP-Fluorescein 480/535 程序测定 FP 值。采用紫外可见分光光度法测定示踪物浓度。根据摩尔消光系数  $\epsilon = 3.56 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,测定示踪物 AVA-SMX 在 357 nm 和 AF-SMXZ 在 492 nm 处的吸光值(*A*)。根据公式  $C_{\text{tracer}} = A/\epsilon L$  分别估算两种示踪物浓度。

### 2.5 SMX 标准液和磺胺类干扰物的配制,SMX 样品制备

将磺胺二甲氧基嘧啶溶于甲醇,初始浓度为 5.0 g/L,然后用硼酸缓冲液(BB)稀释到 0.5 g/L。实验过程中,用 BB 溶液稀释 SMX 溶液至 10 个梯度浓度:0.10, 1.0, 10 和 100 μg/L,及 1.0, 5.0, 10, 50, 100 和 250 mg/L。

磺胺类药物磺胺异噁唑(SIZ)、磺胺咪(SG)、磺胺苯吡唑(SPP)和磺胺对甲氧嘧啶(SDM)的标准溶

液的配制与 SMX 方法相同。

称取鸡饲料 100 g, 粉碎, 用 300 mL 甲醇提取 3 次, 减压浓缩至 25 mL, 然后用 BB 溶液定容到 1.0 L, 4 °C 放置保存。

## 2.6 SMX 测定和竞争抑制曲线的绘制

将 50 μL 示踪物与 25 μL 不同浓度的磺胺二甲氧基嘧啶标准品先后加入荧光微孔板孔中, 再加入 70 μL 一定浓度的 SMX 抗体反应 5 min, 得到含不同浓度免疫复合物的反应液。将荧光分光光度计的激发狭缝和发射狭缝均设为 5 nm。以 BB 溶液作为参比溶液, 以 AVA-SMX 和 AF-SMX 总荧光强度为 BB 缓冲液荧光强度 10 倍时的浓度为荧光标记物浓度 (22 μg/L), 测读 FP 值。应用 OriginPro7.0 软件中的四参数方程模块拟合竞争标准曲线。四参数方程为:

$$FP = (A^3/D) / [1 + (X/C)^B] + D \quad (1)$$

其中  $A$  和  $D$  分别代表药物浓度最大和最小时的 FP。 $C$  为中点浓度。当药物浓度等于  $C$  时, 荧光偏振值为  $(A + D) / 2$ , 正处于曲线的拐点处, 浓度为  $IC_{50}$ 。 $B$  表示曲线的陡峭程度, 称斜率因子。以  $IC_{10}$  为检出限,  $IC_{20} \sim IC_{80}$  为检测范围。

## 3 结果与讨论

### 3.1 长春西汀酸的荧光光谱特性

图 1 是长春胺在三氯甲烷中的荧光光谱图。从图 1 可见, AVA 具有较强的荧光, 且量子产率高。在 357 nm 激发光下, 于 453 nm 处产生一个荧光发射峰。AVA 作为荧光标记物, 另外还具有在溶液中稳定, Stock 位移大 (94 nm) 等特点。

### 3.2 示踪物活性鉴定及浓度估测

荧光示踪物 AVA-SMX 是利用 FPIA 法测定 SMX 的关键试剂。本研究以 AVA 为荧光标记物合成了一种新的 SMX 示踪物 (AVA-SMX, 图 2)。以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲醇 (4:2:1, V/V) 为展开剂, 用硅胶薄层色谱法 (TLC) 对 AVA-SMX 进行提纯。由于游离示踪物的 FP 值较小, 当与特异性大分子物质结合以后, 其 FP 值将变大, 所以用 SMX 的多克隆抗体和 FPIA 技术可以对合成的示踪物进行鉴定, 通过观察游离示踪物与结合抗体后的 FP 值的变化可以评估示踪物的活性。游离荧光示踪物 (AVA-SMX) 的 FP 值与荧光示踪物-抗体结合物 (稀释 1000 倍的 SMX 抗体) 的 FP 值比较 (图 3), 荧光示踪物加入 SMX 抗体后 FP 值明显上升, 约为 50 ~ 385 mP, 说明荧光示踪物能与 SMX 抗体产生特异性的结合。

利用紫外可见分光光度法测定示踪物 AVA-SMX 和 AF-SMX 浓度分别为 5.7 和 13.0 mmol/L。

### 3.3 FPIA 方法的建立和评价

FPIA 法的灵敏度和特异性主要由抗体结合性能和荧光示踪物结构决定。为了考察此荧光示踪物的免疫反应效果, 本实验以荧光素-磺胺二甲氧基嘧啶 (AF-SMX) 示踪物为参照, 建立 AVA-SMX 的 FP-SMX 标准曲线。实验中, 将 500 μL SMX 标准品加入到比色皿中, 再加入 500 μL 荧光示踪物和 SMX 抗体, 室温温育 5 min, 检测 FP 值。由 AVA-SMX 和 AF-SMX 荧光示踪物与 SMX 抗体不同浓度 SMX 免疫反应后 FP 值变化结果 (图 4 和表 1) 可知, 以长春西汀酸-磺胺二甲氧基嘧啶 (AVA-SMX) 作为示踪物获得的灵敏度较高, 检出限为 0.5 μg/L。而 AF-SMX 的检出限只有 2.7 μg/L。结果表明, 抗体对 AVA-SMX 荧光示踪物的亲和力较高, 对 AF-SMX 的亲和力相对较低。这可能与 AF-SMX 结构中的酚羟基负电荷与带负电荷抗体产生一定排斥, 不利于与抗体结合有关。

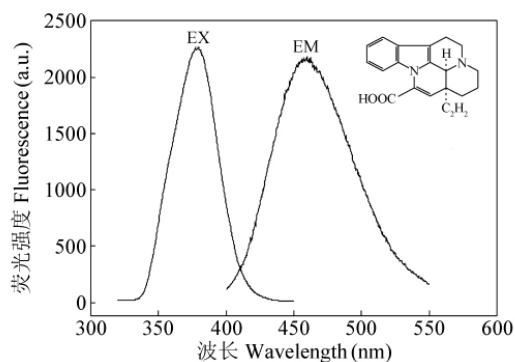


图 1 长春西汀酸的荧光光谱图

Fig. 1 Excitation and emission spectra of apovincaminic acid (AVA)

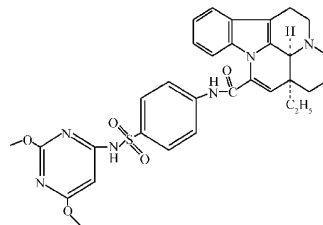


图 2 荧光示踪物的化学结构

Fig. 2 Structure of tracers apovincaminic acid sulfadimethoxine (AVA-SMX)

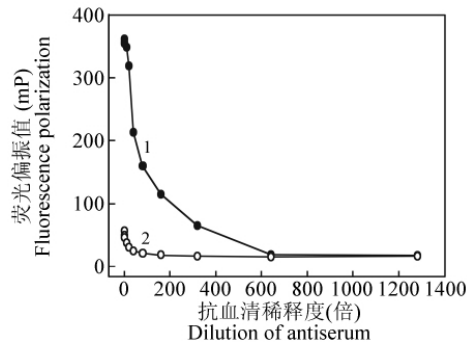


图3 SMX 抗血清、阴性血清与荧光示踪物 AVA-SMX 结合后的 FP 变化曲线

Fig. 3 Dilution curve for anti-sulfadimethoxine polyclonal antibodies and negative antibody with AVA-SMX

1. SMX 抗血清 (SMX antiserum); 2. 阴性血清 (Negative anti-body antiserum)。

### 3.4 方法的重现性和选择性

对 17.0  $\mu\text{g/L}$  磺胺二甲氧基嘧啶平行测定 6 次, 相对标准偏差为 3.0%, 表明本方法的重现性较好。

以磺胺异噁唑 (SIZ)、磺胺咪 (SG)、磺胺苯吡唑 (SPP) 和磺胺对甲氧嘧啶 (SDM) 为干扰物, 进行干扰实验。在 50.0  $\mu\text{g/L}$  磺胺二甲氧基嘧啶 (SMX) 溶液中分别加入相同浓度 (50.0  $\mu\text{g/L}$ ) 的干扰物以及由同浓度 (12.5  $\mu\text{g/L}$ ) 的 SIZ, SG, SPP 和 SDM 组成的混合物, 进行免疫反应和 FPIA 测定, 实验结果如表 2 所示。从表 2 可见, 有 SIZ, SG 和 SPP 干扰物时与无干扰物时 SMX 的测定结果偏差较小, 说明这 3 种干扰物对 SMX 测定的影响小; 有 SDM 存在时, 偏差较大, 说明 SDM 对 SMX 的测定具有一定的影响。这可能与 SDM 和 SMX 的结构相似, 可以竞争结合 SMX 抗体等因素有关。

### 3.5 实际样品分析

利用本方法对市场上 6 种鸡饲料中 SMX 的含量进行了测定, 并与 HPLC 方法进行比较 (鸡饲料样品和 HPLC 数据由湖南省畜牧兽医研究所提供), 仅有 3 个样品检出 SMX, 结果列于表 3。由表 3 可知, 本方法的测定结果与 HPLC 法的测定结果能很好地吻合。本方法可用于检测饲料样品中 SMX 的含量。

表 2 本方法的选择性

Table 2 Selectivity of proposed method

| 样品<br>Sample                   | 测定值<br>Found ( $\mu\text{g/L}$ ) | 偏差<br>SD (%) |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------|
| 1#(SMX + SIZ)                  | 50.3                             | 0.6          |
| 2#(SMX + SG)                   | 49.8                             | 0.4          |
| 3#(SMX + SPP)                  | 50.1                             | 0.2          |
| 4#(SMX + SDM)                  | 49.2                             | 1.6          |
| 5#(SMX + SIZ + SG + SPP + SDM) | 48.3                             | 1.1          |

SIZ: Sulfafurazole; SG: Sulfaguamide; SPP: Sulphaphenazole; SDM: Sulfameter.

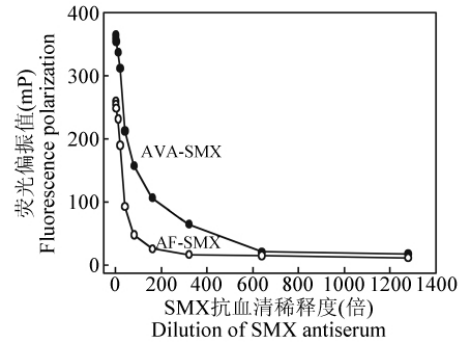


图 4 两种示踪物与 SMX 抗体结合效价曲线

Fig. 4 Dilution curve for anti-SMX antibodies and negative antibody with various tracers

表 1 两种基于两种示踪物的 FPIA 法结果

Table 1 Analytical characteristics of fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for SMX with different tracers

| 荧光标记物<br>Tracer | 效价<br>Titer | 检出限<br>LOD<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 检测范围<br>Detection range<br>( $\mu\text{g/L}$ ) |
|-----------------|-------------|-----------------------------------|--|
| AF-SMX          | 1/700       | 2.7                               | 2.7 ~ 287                                      |
| AVA-SMX         | 1/500       | 0.5                               | 0.5 ~ 146                                      |

表 3 饲料中 SMX 含量的测定

Table 3 SMX determination in feed samples

| 样品<br>Sample | 荧光偏振免疫法<br>Proposed method<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 高效液相色谱法<br>HPLC<br>( $\mu\text{g/L}$ ) |
|--------------|---|--|
| 1#           | 19.93   | 20.11                                  |
| 2#           | 16.57   | 17.43                                  |
| 3#           | 8.23  | 8.51                                   |

## Referencea

- Matuszczyk G D, Knopp R, Niesser R. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 354(1): 41 ~ 47
- YOU Hai-Qin (尤海琴), LIU Lang (刘浪), LIU Shu-Zhao (刘曙照). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(4): 577 ~ 580

- 3 Liang C Z , Jin R Y , Gui W J , Zhu G N. *Environ. Sci. Technol.* , **2007** , 41( 19) : 6783 ~ 6788
- 4 LIU Nan( 刘楠) , SU Pu( 苏璞) , GAO Zhi-Xian( 高志贤) , ZHU Mao-Xiang( 朱茂详) , YANG Zhi-Hua( 杨陟华) , PAN Xiu-Jie( 潘秀娟) , CHAO Fu-Huan( 晁福寰) . *Chinese J. Anal. Chem.* ( 分析化学) , **2009** , 37( 7) : 960 ~ 964
- 5 Takeshita N , Kakiuchi N , Kanazawa T , Komoda Y , Nishizawa M , Tani T , Shimotohno K. *Anal. Biochem.* , **1997** , 247( 2) : 242 ~ 246
- 6 Rossier E , Miller H , McCulloch B , Sullivan L , Ward K. *J. Clin. Microbiol.* , **1991** , 29( 5) : 1069 ~ 1071
- 7 WANG Zhan-Hui( 王战辉) , ZHANG Su-Xia( 张素霞) , SHEN Jian-Zhong( 沈建忠) , Eremin S A. *Spectroscopy and Spectral Analysis*( 光谱学与光谱分析) , **2007** , 27( 11) : 2299 ~ 2306
- 8 Tanabe A , Mitobe H , Kawata K , Yasuhara A , Shibamoto T. *J. Agric. Food Chem.* , **2001** , 49( 8) : 3847 ~ 3852
- 9 Deryabina M A , Yakovleva Y N , Popova V A , Eremin S A. *Anal. Chem.* , **2005** , 60( 1) : 80 ~ 85
- 10 WANG Zhan-Hui( 王战辉) , ZHANG Su-Xia( 张素霞) , SHEN Jian-Zhong( 沈建忠) . *Spectroscopy and Spectral Analysis* ( 光谱学与光谱分析) , **2008** , 28( 7) : 1621 ~ 1625
- 11 Eremin S A , Murtazina N R , Ermolenko D N , Zherdev A V , Mart'ianov A A , Yazynina E V , Michura I V , Formanovsky A A , Dzantiev B B. *Anal. Lett.* , **2005** , 38( 6) : 951 ~ 969
- 12 Yakovleva J N , Lobanova A Y , Shutaleva E A , Kourkina M A , Mart'ianov A A , Zherdev A V , Dzantiev B B , Eremin S A. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2004** , 378( 3) : 634 ~ 641
- 13 Maragos C M , Jolley M E , Plattner R D , Nasir M S. *J. Agric. Food Chem.* , **2001** , 49( 2) : 596 ~ 602
- 14 Si back R , Nygern J , Kubista M. *Spectrochim. Acta Part A.* , **1995** , 51( 6) : 7 ~ 21
- 15 Song L , Varma C A , Verhoeven J W , Tanke H J. *J. Biophys.* , **1996** , 70( 6) : 2959 ~ 2968
- 16 Fischhof P K , Moslinger-Gehmayr R , Herrmann W M , Friedmann A , Russmann D L. *Neuropsychobiology* , **1996** , 34( 1) : 29 ~ 35
- 17 Umemoto N , Kato Y , Endo N , Takeda Y , Hara T. *Int. J. Cancer* , **1989** , 43( 4) : 677 ~ 684

## A Fluorescence Polarization Immunoassay Method Based on Apovincaminic Acid for Determination of Sulfadimethoxine

WANG Xiao-Yong<sup>1</sup> , GONG Fu-Chun<sup>\* 1 3</sup> , TANG Lian-Fei<sup>2</sup> , LI Zhi-Zhang<sup>1</sup> ,  
ZHENG Xing-Liang<sup>3</sup> , ZHAN Xue-Hui<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( Department of Chemistry and Biology , Hunan University of Science and Engineering)

<sup>2</sup>( Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Changsha 410004)

<sup>3</sup>( College of Chemistry and Biological Engineering , Changsha University of Science and Technology , Changsha 410004)

**Abstract** The fluorescence labeling apovincaminic acid (AVA) and tracers apovincaminic acid-sulfadimethoxine were synthesized and used in the fluorescence polarization immunoassay method (FPIA) for the analysis of sulfadimethoxine (SMX). By using AVA as indicating materials, tracers apovincaminic acid-sulfadimethoxine (AVA-SMX) were prepared, which were purified by thin layer chromatography and identified by FPIA. The fluorescence properties of AVA and the characteristic performance of tracers immunoreacting with SMX antibodies were investigated by using tracers 5-aminofluorescein-sulfadimethoxine conjugates (AF-SMX) as a reference. The results indicated that the detection limit for AF-SMX was 2.7  $\mu\text{g/L}$ , and the dynamic range for AVA-SMX was 0.5 - 146  $\mu\text{g/L}$  with a detection limit of 0.5  $\mu\text{g/L}$ . The sensitivity of the novel tracers was also estimated by dilution curves and calibration curves, respectively. The RSD of AVA-based FPIA method for SMX determination is 3.0%, and a good selectivity can be obtained with the solutions in the presence of the other sulfa drugs. The proposed AVA-based FPIA was used to determine SMX in feed and the result is well agreed with that obtained with HPLC.

**Keywords** Fluorescence polarization immunoassay; Fluorescence labeling; Apovincaminic acid; Sulfadimethoxine

( Received 20 January 2010; accepted 4 June 2010)