

# 生物素主要检测方法综述

齐鑫鹏, 林子谣, 吕秋月, 李琦, 莫晓凤, 韩国成\*

桂林电子科技大学, 广西 桂林

收稿日期: 2022年4月24日; 录用日期: 2022年5月9日; 发布日期: 2022年5月18日

## 摘要

生物素(biotin)别称维生素B<sub>7</sub>, 也可称其为维生素H、辅酶R等, 在碳水化合物、氨基酸和脂肪酸的代谢中作为几种羧化酶的必需辅酶发挥重要作用, 对于构成视沉细胞内感光物质、维持上皮组织结构的完整和健全、增强机体免疫反应和抵抗力、维持正常生长发育等有重要作用。因此检测各类日常食物中的生物素以及人类每天摄入生物素的含量意义重大。目前检测生物素的方法有微生物法、色谱法、荧光法、分光光度法、免疫法、生物传感器法等, 本文主要对于生物素主要检测方法进行综述, 尤其是生物传感器方法。

## 关键词

生物素, 检测, 生物传感器, 电化学, 色谱法

# Review on Main Detection Methods of Biotin

Xinpeng Qi, Ziyao Lin, Qiuyue Lyu, Qi Li, Xiaofeng Mo, Guocheng Han\*

Guilin University of Electronic Technology, Guilin Guangxi

Received: Apr. 24<sup>th</sup>, 2022; accepted: May 9<sup>th</sup>, 2022; published: May 18<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Biotin, also known as vitamin B<sub>7</sub>, can also be called vitamin H and coenzyme R; it plays an important role as an essential coenzyme of several carboxylase enzymes in the metabolism of carbohydrates, amino acids and fatty acids and also in forming photosensitive substances in retinal cells, maintaining the integrity and soundness of epithelial tissue structure, enhancing immune response and resistance, and maintaining normal growth and development. Therefore, it is of great

\*通讯作者。

significance to detect the content of biotin in various daily foods and the daily intake of biotin by humans. At present, the detection methods of biotin include microbial method, chromatography, fluorescence method, spectrophotometry, immunoassay, biosensor method and so on. This paper mainly summarizes the main detection methods of biotin, especially biosensor methods.

## Keywords

Biotin, Detection, Biosensor, Electrochemistry, Chromatography

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

生物素(biotin)别称维生素 B<sub>7</sub>, 也可称其为维生素 H、辅酶 R [1]等, 在碳水化合物、氨基酸和脂肪酸的代谢中作为几种羧化酶的必需辅酶发挥重要作用。文献报道[2] [3]人体肠道微生物可以合成一些生物素, 但根据食品和营养委员会的估计, 成人生物素的适当摄入量为 30~100 微克/天, 有益于刺激头发生长、治疗某些疾病, 如生物素缺乏症、脂质紊乱、糖尿病和糖尿病性周围神经病变。婴幼儿肠道功能较弱无法合成生物素[4], 并且饮食种类单一, 缺乏生物素会造成严重的神经症状, 比如出现躁狂、嗜睡、发育迟缓以及舌炎和皮炎等症状。生物素可以增强机体的免疫力, 维持增长机体的溶酶体膜, 参与克雷布斯循环、胰岛细胞基因表达和胰岛素分泌[5], 此外, 生物素还可以作为探针精准靶向癌细胞[6], 在生理和病理过程中发挥极大作用。

作为水溶性维生素 B 复合物的一员, 生物素是一种重要的微量营养素, 是线粒体、dria 和细胞质中发现的五种羧化酶的共同因子。总的来说, 这些生物素结合酶催化代谢途径中的关键步骤, 包括氨基酸分解代谢、糖原生成、脂肪生成和能量转换。除了作为修复组织的功能外, 生物素还被确定在基因表达、细胞内信号通路和激素生物素化的调节中发挥作用。因此, 毫不奇怪, 生物素缺乏已被证明会导致多种临床疾病, 从皮肤病和神经异常到生长发育迟缓。其中生物素在体内氧化生成顺视黄醛和反视黄醛, 构成视沉细胞内感光物质; 并且能够通过能量产生促进某些蛋白质的合成; 参与维生素 B<sub>12</sub>、叶酸和泛酸的代谢; 促进汗腺、神经组织和骨髓的健康; 减少湿疹和皮炎症状; 防止白发和脱发, 有助于治疗秃头; 对抑郁和失眠有益; 促进尿素合成和排泄; 可用于治疗动脉硬化、中风、脂质代谢异常、高血压、冠心病和血液循环障碍。当生物素缺乏时, 生殖功能下降, 骨骼生长不良, 胚胎和幼儿的生长发育受阻。因此, 研究药物、保健品和日常食品中的生物素是否满足人们日常摄入含量是非常必要的。

生物素在生理和病理过程中发挥极大作用, 因此研究快速、简便、可靠的方法用于生物素的测定是非常必要。

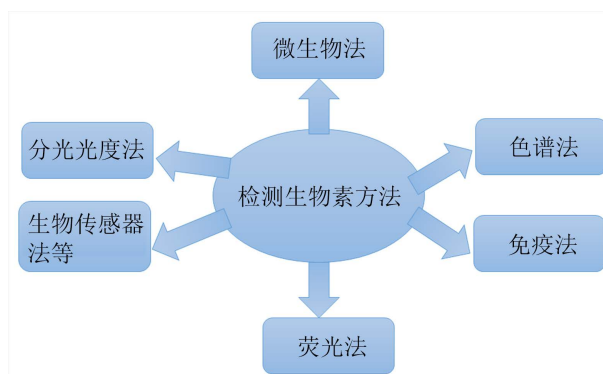
## 2. 生物素主要检测方法

如图 1 所示, 生物素的检测方法主要有微生物法[7]、色谱法[8] [9] [10] [11]、荧光法[12]、分光光度法[13]、傅里叶变换红外反射吸收光谱法[14]、免疫法[15] [16] [17] [18]、生物传感器法[19]-[25]等。

### 1) 微生物法

微生物法主要有比浊法、滤纸片法等, 并且微生物检测生物素主要分为传统国际方法和试剂盒法[26]。其原理为一些细菌的生长强烈依赖于特定的维生素, 可用于制备选择性培养基, 即要测量的维生素量直

接影响细菌的生长。添加不同浓度的待测维生素作为标记曲线，可半定量测定样品中特定维生素的含量[7]。



**Figure 1.** Main detection methods of biotin  
**图 1.** 生物素的主要检测方法

王志伟[7]采用培养植物乳杆菌检测婴幼儿配方奶粉中的生物素含量，线性范围为 0.1~1 ng；刘志楠[27]等人采用植物乳酸杆菌、干酪乳杆菌、莱士曼氏乳酸杆菌对于 183 组牛奶中的生物素及叶酸机检测，实验得到牛奶中生物素含量多数集中在 2~3  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 。曹艳娟[28]等人依据相关统计学方法，对影响全营养配方食品中生物素含量结果的不确定度分量进行探究和评定，结果表明生物素含量的扩展不确定度为 1.84  $\mu\text{g}/100\text{g}$  ( $k = 2$ )。

## 2) 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)是近几十年发展起来的一种高效快速分离检测技术，其测定原理是根据被分离组分在流动相和固定相之间的各种微观作用的差异。目前 HPLC 经常结合质谱法一起检测食品或者其他物质中的维生素等物质，而液相色谱-质谱联用技术(Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS)是将色谱法中的高分离能力和质谱法中的高选择性结合起来，具有了色谱分离和质谱鉴定的双重功能。

Ji-Young Kim [9]等人利用三柱体系高效液相色谱法检测韩国人消费量高的食物中的生物素浓度，在已优化的实验条件下，这些食物中含有的生物素：大豆(2.037  $\mu\text{g}/\text{g}$ )、猪肝(0.455  $\mu\text{g}/\text{g}$ )、大米(3.433  $\mu\text{g}/\text{g}$ )、啤酒(4.428  $\mu\text{g}/\text{g}/\text{day}$ )等。Ulrich Höller [10]等人开发了两种基于 HPLC-MS/MS 定量饲料、食品、片剂和预混料中微生物的灵敏和特异方法并进行了验证。关键步骤是将样品用木瓜蛋白酶进行酶消化，然后用硫酸进行碱提取或水解，用氘化生物素作为内标物，用于补偿样品制备过程中的损失和样品制备过程中的离子抑制。该定量限为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，与微生物法进行对比，两个方法结果一致，但是该方法比常用的植物乳杆菌微生物检测法更快。Shuko Nojiri [29]等人构建了一种灵敏和选择性的柱后衍生高效液相色谱法，使用邻苯二甲醛(OPA)和 3-巯基丙酸(3-MPA)用于测定药物制剂中的生物素。S. Lahély [30]等人提出了一种通过反相液相色谱法测定各种食品中生物素含量的方法，包括通过酶水解(木瓜蛋白酶)提取维生素体(d-生物素和 d-生物素)，必要时使用高淀粉酶，用荧光检测通过抗生物素 FITC (荧光素 5-异硫氰酸酯)柱后衍生的配合物。该方法具有良好的回收率(90%~106%)、令人满意的重复性(变异系数小于 7%)和极低的检测限(0.005  $\mu\text{g}/\text{g}$ )。Nicholas A. Cellar [31]等人建立了一种同时测定婴儿配方奶粉及相关营养素中的核黄素( $\text{B}_2$ )、烟酰胺和烟酸( $\text{B}_3$ )、泛酸( $\text{B}_5$ )、吡哆醇( $\text{B}_6$ )、生物素( $\text{B}_7$ )和叶酸( $\text{B}_9$ )的改进方法。该方法采用了一种简单的、高效、快速的样品制备，然后进行液相色谱-串联质谱分析(LC-MS/MS)。它改进了以前的方法，提供了简单而坚固的样品制备，通过改进色谱条件，最终得到高度准确和精确的方法可用于测定各

种配方中的水溶性维生素。该方法经过六个月的验证，两名分析员在两个不同实验室的仪器上工作。得到中间的精密度的相对标准偏差平均为  $3.4\% \pm 2.6\%$ ，平均过峰回收率平均为  $100.2\% \pm 2.4\%$  ( $n = 100$ )。

### 3) 荧光法

荧光法测定生物素的原理是生物素与荧光素反应，从而引起荧光强度增加或者猝灭。其中 Robert H. Batchelor [12]等人描述了一种基微孔板的荧光共振能量转移的高通量荧光测定法，用于检测与蛋白质或核酸连接的生物素。该分析利用 Alexa Fluor@488 染料标记的 avidin 与猝灭染料 2-(4'-羟基偶氮苯)苯甲酸 (HABA)结合成复合物，占据抗生物素蛋白的生物素结合位点。在没有生物素的情况下，HABA 通过 FRET 猝灭 Alexa Fluor@488 染料的荧光发射。当生物素与 Alexa Fluor@488 染料标记的抗生物素结合时，HABA 被置换，导致 FRET 效率降低。这种机制导致荧光强度增加，与样品中生物素的含量直接相关。

### 4) 傅里叶红外光谱法

傅里叶红外光谱法是基于对干涉后的红外光进行傅里叶变换，傅里叶红外光谱仪主要由红外光源、光阑、干涉仪(分束器、动镜、定镜)、样品室、检测器以及各种红外反射镜、激光器、控制电路板和电源组成。Yam C-M [14]等人将傅里叶变换红外反射吸收光谱(FT-IRRAS)连续用于自组装单层的平面金基底上覆盖半胱胺的共价固定监测生物素，以及转换抗生物素和生物素的分子识别。通过使用各种过渡金属羰基探针标记抗生物素和生物素，极大地提高了该检测的选择性。通过吸附牛血清白蛋白，阻断非特异性结合位点，优化了亲和素与生物素的结合。

### 5) 免疫法

抗原和抗体结合即发生免疫反应，其特异性很高，具有极高的选择性和灵敏度。免疫法是基于抗体抗原特异性结合，而生物素的抗体是抗生物素蛋白，又称亲和素。Shao-Yi Hou [15]等人开发了一种超灵敏、简单、快速的生物素-肽检测免疫分析方法，该方法使用金纳米粒子与抗体结合。将生物素共价连接到肽上，再将生物素-肽结合在硝化纤维素膜上，抗体包裹的金纳米粒子与生物素-肽结合形成红点。Xing Chen 等人采用自制的 SPR 分析系统和变性牛血清白蛋白(dBSA)的 SPR 芯片，基于抑制免疫分析法检测生物素。优化了再生条件，采用自组装方法制备了 dBSA SPR 芯片，生物素衍生物通过吸附固定在 dBSA SPR 芯片上。使用商用仪器和葡聚糖 SPR 芯片(CM5)进行相同的实验。基于生物素抗体和生物素衍生物之间的免疫反应实验，生物素抗体浓度优化为约  $5 \mu\text{g/mL}$ ，以获得高灵敏度，用于后续的抑制免疫分析。使用自制仪器和 dBSA SPR 芯片，生物素的最低检测限为  $0.1 \mu\text{g/mL}$ ，检测范围为  $0.1\sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 。所自制的仪器和 dBSA SPR 芯片的检测结果与商业方法相当。

综上所述，微生物法成本低，但是检测周期长、样本间平行性不好、菌种保存困难、操作复杂等；高效液相色谱法对样品的前处理要求较高，要求样品纯度高，无杂质，复杂化了前期人工处理样品的工序；荧光法可靠性存在缺陷；分光光度法是因为生物素无典型的紫外和荧光发色团，不适合在含量比较低的样品中检测生物素；免疫法操作简便，结果准确，重复性好，但是对于环境的条件比较苛刻。生物传感器法操作简单、成本低、便于携带、反应灵敏和检测速度，近期得到飞速发展。

### 6) 生物传感器法

生物传感器是一种对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的仪器。是由固定化的生物敏感材料作识别元件比如生物活性物质等、适当的理化换能器如氧电极、场效应管等及信号放大装置构成的分析工具或系统。

#### i) 光学生物传感器法

光学生物传感器分为无源光学生物传感器、光致光学生物传感器、电致光学生物传感器，一般用于检测生物素的光学生物传感器为电化学发光。刘世利[32]等人建立了光电化学系统竞争性检测生物素小分子浓度的方法。采用联吡啶钌作为标记物，以氧化锡纳米颗粒为电极，草酸盐为电子供体还原标记物，

竞争性光电检测方法检测生物素,检出限为  $8 \mu\text{g/L}$ 。李红[33]基于链霉亲和素磁珠与荧光染料 SYBR Green I (SG)辅助信号放大技术,提出了一种简单、非标记的荧光生物传感方法用于生物素的检测。在最优化的实验条件下,该传感体系的线性浓度范围在  $4\sim 24 \text{ ng mL}^{-1}$  内,该方法的检测限为  $1.19 \text{ ng mL}^{-1}$ 。张浩[34]提出一种基于单链 DNA (ssDNA)与氧化石墨烯之间强相互作用和生物素与链霉亲和素(SA)特异性相互作用的新的荧光传感系统检测生物素。

### ii) 比色生物传感器法

比色法是以生成有色化合物的显色反应为基础,通过比较或测量有色物质溶液颜色深度来确定待测组分含量的方法。李红[33]基于 DNAzyme 和 G-四联体串联信号放大的比色生物传感器用于生物素的检测。根据溶液颜色和紫外吸收信号的变化,可以实现对生物素快速、灵敏、可视化的检测。

### iii) 电化学生物传感器法

如图 2 所示,电化学生物传感器是指由生物体成分(酶、抗原、抗体、激素等)或者生物体本身(细胞、细胞器、组织等)作为敏感元件,电极(固体电极、离子选择性电极、气敏电极等)作为转换原件、以电势、电流、阻抗等为特征检测信号的传感器。电化学生物传感器的应用范围广泛,比如:医药领域、食品安全、环境检测等等生活实践中。电化学生物传感器分为:电化学免疫传感器、电化学非免疫传感器(适体、DNA、生物活性物质等)。在各种分析方法中,电化学方法由于操作简单、成本低、便于携带、反应灵敏和检测速度快被普遍使用。电化学检测生物素的主要机理是基于在电极表面上生物素的氧化还原或与某种类型的探针反应,通过捕获的电化学信号的不同变化检测生物素的浓度,构建修饰电极需要具有优异的电荷传输能力,并可以获得强的电化学响应的一种方法。

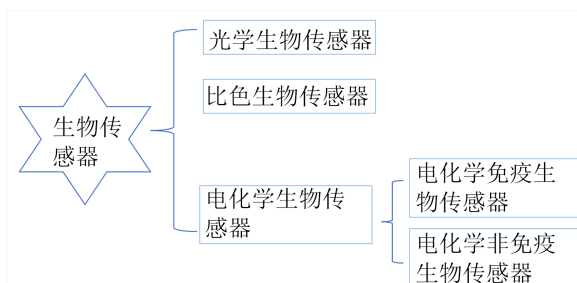


Figure 2. Biosensor classification  
图 2. 生物传感器分类

Julien Biscay [19]等人使用磁珠和可重复使用丝网印刷电化学阵列进行生物素的检测分析,该反应方案基于生物素和辣根过氧化物酶(B-HRP)标记的生物素之间的一步竞争分析如图 3。采用链霉亲和素(Strep MB)、生物素和 B-HRP 修饰的磁珠混合物进行修饰丝网印刷电极。生物素的线性范围为  $0.1\sim 250 \text{ nM}$ ,灵敏度为  $10^{-2} \mu\text{A nM}^{-1}$ 。

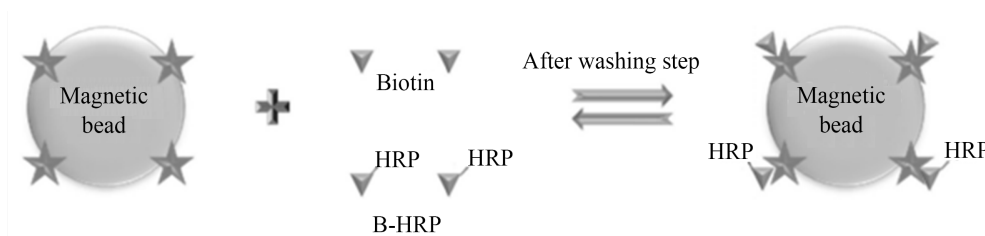


Figure 3. Build a competitive scheme for detecting biosensors [19]  
图 3. 构建检测生物传感器的竞争方案[19]



并且, Ja-an Annie Ho [22]等人研究了两种替代的固定化方法,以增强丝网印刷石墨电极(SPGE)上抗体的定向性。第一种方法是将金纳米粒子沉积到 SPGE 上,然后通过金-硫醇键吸附抗生物素抗体的单价半抗体(monoAb)片段。对于第二种技术,我们通过制备呈现 SPGE 表面的硼酸与该抗生物素抗体的碳水化合物单元相互作用,利用硼酸对糖部分的亲和力。利用这种方法制备了一种超灵敏的电化学免疫传感器可用于检测浓度低至  $0.19 \text{ pg}$  的生物素。Ting-Yang Chen [24]等人展示了一种集成的生物传感器,该传感器带有一个薄膜晶体管,用于记录生物分子携带的电荷,以及一个微流控通道,用于检测目标溶液的扩散特性。该传感器能够通过监测晶体管电流的瞬态响应来检测链霉亲和素-生物素复合物的结合相互作用。Silvina V. Kergaravat [6]等人研究了一种用于食品中生物素快速测定的电化学磁生物传感器。在链霉亲和素修饰的磁性微球作为固体载体上以直接竞争形式进行亲和反应。生物素化辣根过氧化物酶(biotinHRP)与样品中的游离生物素竞争磁性微球上链霉亲和素的结合位点。修饰后的磁珠很容易被磁性石墨-环氧树脂复合电极捕获,电化学信号基于添加过氧化氢作为底物和邻菲二胺作为共基质的 HRP 酶的酶活性。响应通过方波伏安法进行电化学检测。检测限为  $8.4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  的生物素( $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ),动态范围为  $0.94 \sim 2.4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ 。Mai Mai Khoo [35]等人开发一种如图 4 所示简单的电化学免疫传感器,用于直接检测生物素,对于监测生物素含量非常重要。置换法用于生物素检测,在游离生物素存在的情况下,表面结合抗体从免疫传感器表面分离。使用这种电化学免疫传感器检测生物素时,不需要对样品进行预处理。Yinhua Lei [36]等人报告了一种利用悬浮纳米颗粒晶体(S-NPC)作为基于纳米流体电动力学原理的电读出生物传感器的方法。作为初步的证明,使用粒径为  $520 \text{ nm}$  的链霉亲和素修饰 S-NPC 检测 PBS 缓冲液中的生物素。目前的结果表明,这种基于纳米流体的生物传感器对生物素的检测范围约为  $1 \text{ nM} \sim 10 \text{ mM}$ ,灵敏度为  $160 \text{ nS/nM}$ 。并且有使用酶链接检测生物素,如 ZJ Huan [37]等人通过将生物素-牛血清白蛋白结合物包被在聚苯乙烯微板上以结合抗生物素蛋白- $\beta$ -半乳糖苷酶结合物的竞争来定量游离生物素。通过与以下荧光底物之一,试卤灵  $\beta$ -D-半乳糖苷和荧光素二  $\beta$ -D-半乳糖苷反应,在荧光板读数器中检测出竞争导致残留在板表面上的酶缀合物。常规可以检测到低至  $0.1 \text{ nmol}$  的游离生物素。

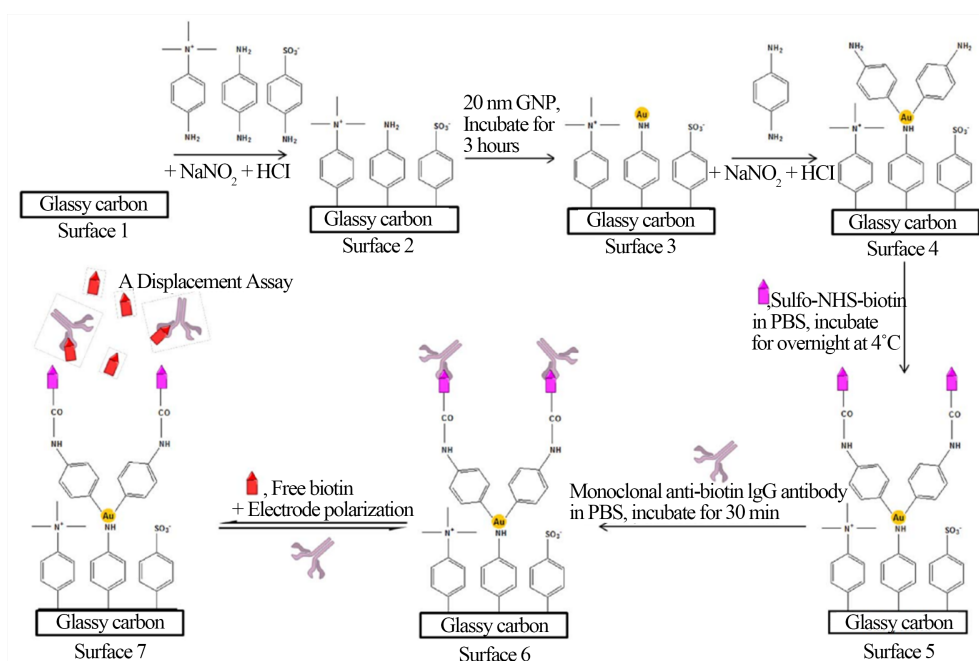


Figure 4. Schematic diagram of electrochemical immunosensor surface fabrication [35]

图 4. 电化学免疫传感器表面制作示意图[35]

Alyah Buzid [21]等人研究了 Nafion 在掺硼金刚石电极(BDD)表面形成稳定的膜, 修饰电极能够氧化生物素, 可用于生物素的灵敏检测, 检测限为 5 nM, 即血浆中生物素的平均正常水平。该方法已成功应用于人血浆样品和一种常见保健品中生物素的测定。

其中, 微生物法作为标准化方法, 因为培养微生物的时间长, 并且需求高, 培养环境需求高。荧光法具有灵敏度高、分析速度快的优点, 但是其具有干扰严重, 荧光物质不好确定等缺点。分光光度计具有灵敏度较高, 仪器设备简单, 操作简单、快捷等优点, 缺点是其准确度相对来说不是很高。免疫法操作简便, 结果准确, 重复性好, 但是对于环境的条件比较苛刻。而电化学分析法对于目标分析物的测定分析快速、具有选择性和高灵敏度。在涉及电化学的技术中, 检测技术已被广泛应用于不同类型的药物的分析中物质。电化学生物传感器具有检测限低、相对简单、灵敏度高、成本低等重要优点, 并且易于便携化、设备化、自动化。

### 3. 结论

在生物体内存在各种具有不同的生物和医学功能的小分子, 而生物素是一种水溶性维生素, 可作为辅酶参与生物体内的新陈代谢和生化过程。虽然在很多食物中存在, 但是孕妇以及婴幼儿都会面临生物素缺乏的情况, 所以在婴幼儿配方食物中至少需要 1.5 mg 的生物素用于满足婴幼儿的生物素需求。已经报导过的检测生物素的方法有微生物法、免疫法、光学法、色谱法、生物传感器法等, 但是这些方法都会有一些缺点, 比如复杂的预处理、操作时间长、稳定性不好、抗干扰能力差等, 所以我们还需要探究更多检测生物素的方法, 应用于检测不同食物中以及临床医学上的标准方法。

### 基金项目

大学生创新创业计划项目(S202110595252, S202110595250)资助。

### 参考文献

- [1] Szychowski, J., Mahdavi, A., Hodas, J.J.L., *et al.* (2010) Cleavable Biotin Probes for Labeling of Biomolecules via Azide-Alkyne Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 18351-18360. <https://doi.org/10.1021/ja1083909>
- [2] 喻凌寒, 苏流坤. 婴幼儿配方食品中生物素的高效液相色谱-质谱联用测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(2): 231-234.
- [3] 相坛坛, 王明月, 吕岱竹, 等. 食品中水溶性维生素测定方法的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(18): 190-196.
- [4] 殷晓红, 杨金宝, 张满宇, 等. 婴儿配方食品中生物素测定[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 117-119.
- [5] Trambas, C., Lu, Z., Yen, T., *et al.* (2018) Characterization of the Scope and Magnitude of Biotin Interference in Susceptible Roche Elecsys Competitive and Sandwich Immunoassays. *Annals of Clinical Biochemistry*, **55**, 205-215. <https://doi.org/10.1177/0004563217701777>
- [6] Kergaravat, S.V., Gómez, G.A., Fabiano, S.N., *et al.* (2012) Biotin Determination in Food Supplements by an Electrochemical Magneto Biosensor. *Talanta*, **97**, 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.003>
- [7] 王志伟. 婴幼儿乳粉中生物素含量的测定研究[J]. 包装与食品机械, 2013, 31(3): 66-72.
- [8] Nshime, B., Koedam, J., Stanton, B., *et al.* (2019) Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Biotin and Vitamin B12 in Vitamin B Supplements. *Journal of AOAC International*, **102**, 445-450. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0029>
- [9] Kim, J.Y. and Oh, C.H. (2011) Analysis of Biotin in Korean Representative Foods and Dietary Intake Assessment for Korean. *Food Science and Biotechnology*, **20**, 1043-1049. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0142-2>
- [10] Höller, U., Wachter, F., Wehrli, C., *et al.* (2005) Quantification of Biotin in Feed, Food, Tablets, and Premixes Using HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **831**, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.021>
- [11] Teo, P. and Liu, D. (2013) Determination of Biotin in Antarctic Krill (*Euphausia superba*) by High-Performance TLC

- with Different Post-Chromatographic Derivatizations. *Journal of Separation Science*, **36**, 2703-2708. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300121>
- [12] Batchelor, R.H., Sarkez, A., Cox, W.G., *et al.* (2007) Fluorometric Assay for Quantitation of Biotin Covalently Attached to Proteins and Nucleic Acids. *Biotechniques*, **43**, 503-507. <https://doi.org/10.2144/000112564>
- [13] Niedbala, R.S., Gergits, F. and Schray, K.J. (1986) A Spectrophotometric Assay for Nanogram Quantities of Biotin and Avidin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **13**, 205-215. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(86\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0165-022x(86)90099-0)
- [14] Yam, C.M., Pradier, C.M., Salmain, M., *et al.* (2002) Molecular Recognition of Avidin on Biotin-Functionalized Gold Surfaces Detected by FT-IRRAS and Use of Metal Carbonyl Probes. *Journal of Colloid and Interface Science*, **245**, 204-207. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7981>
- [15] Hou, S.Y., Chen, H.K., Cheng, H.C. and Huang, C.Y. (2007) Development of Zeptomole and Attomolar Detection Sensitivity of Biotin-Peptide Using a Dot-Blot Gold Nanoparticle Immunoassay. *Analytical Chemistry*, **79**, 980-985. <https://doi.org/10.1021/ac061507g>
- [16] Aissa, A.B., Herrera-Chacon, A., Pupin, R.R., *et al.* (2017) Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for the Isolation and Detection of Biotin and Biotinylated Biomolecules. *Biosensors and Bioelectronics*, **88**, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.096>
- [17] Li, J., Wagar, E.A. and Meng, Q.H. (2018) Comprehensive Assessment of Biotin Interference in Immunoassays. *Clinica Chimica Acta*, **487**, 293-298. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.013>
- [18] Chen, X., Zhang, L. and Cui, D. (2017) Surface Plasmon Resonance Immunoassay for Biotin Determination on a Home-Made Instrument. *Procedia Technology*, **27**, 87-88. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.037>
- [19] Biscay, J., García, M.B.G. and García, A.C. (2014) Electrochemical Biotin Determination Based on a Screen Printed Carbon Electrode Array and Magnetic Beads. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **205**, 426-432. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.042>
- [20] Buzid, A., Hayes, P.E., Glennon, J.D., *et al.* (2019) Captavidin as a Regenerable Biorecognition Element on Boron-Doped Diamond for Biotin Sensing. *Analytica Chimica Acta*, **1059**, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.058>
- [21] Alyah, B., McGlacken, G.P., Glennon, J.D., *et al.* (2018) Electrochemical Sensing of Biotin Using Nafion-Modified Boron-Doped Diamond Electrode. *ACS Omega*, **3**, 7776-7782. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01209>
- [22] Ho, J.A.A., Hsu, W.L., Liao, W.C., *et al.* (2010) Ultrasensitive Electrochemical Detection of Biotin Using Electrically Addressable Site-Oriented Antibody Immobilization Approach via Aminophenyl Boronic Acid. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1021-1027. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.048>
- [23] Wang, S., Hossain, M.Z., Shinozuka, K., *et al.* (2020) Graphene Field-Effect Transistor Biosensor for Detection of Biotin with Ultrahigh Sensitivity and Specificity. *Biosensors and Bioelectronics*, **165**, 112363-112372. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112363>
- [24] Chen, T.Y., Yang, T.H., Wu, N.T., *et al.* (2017) Transient Analysis of Streptavidin-Biotin Complex Detection Using an IGZO Thin Film Transistor-based Biosensor Integrated with a Microfluidic Channel. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **244**, 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.050>
- [25] Shi, D., Sheng, F., Zhang, X., *et al.* (2018) Gold Nanoparticle Aggregation: Colorimetric Detection of the Interactions between Avidin and Biotin. *Talanta*, **185**, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.102>
- [26] 蔡金星, 薛军, 曾海, 等. 生物素的特点及其在生物医学中的应用概述[J]. 海峡药学, 2020, 32(7): 155-157.
- [27] 刘志楠, 赵雅丽, 李海礁, 等. 牛奶中叶酸、VB12 和生物素本底含量的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 1-4.
- [28] 曹艳娟, 蔡伟江, 蔡晓霞. 微生物法测定全营养配方食品中生物素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(23): 8662-8669.
- [29] Nojiri, S., Kamata, K. and Nishijima, M. (1998) Fluorescence Detection of Biotin Using Post-Column Derivatization with OPA in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **16**, 1357-1362. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00157-X)
- [30] Lahély, S., Ndaw, S., Arella, F., *et al.* (1999) Determination of Biotin in Foods by High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization and Fluorimetric Detection. *Food Chemistry*, **65**, 253-258. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00185-X)
- [31] Cellar, N.A., McClure, S.C., Salvati, L.M., *et al.* (2016) A New Sample Preparation and Separation Combination for Precise, Accurate, Rapid, and Simultaneous Determination of Vitamins B1, B2, B3, B5, B6, B7, and B9 in Infant Formula and Related Nutritionals by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, **934**, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.058>



- [32] 刘世利, 陈守臻, 赵倩, 等. 光电化学竞争法检测生物素[J]. 分析化学, 2013, 41(10): 1477-1481.
- [33] 李红. 基于纳米材料的光学传感新方法用于生物素和 MNase 酶检测[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南大学, 2014.
- [34] 张浩. 氧化石墨烯和荧光纳米粒子在生物传感器方面的应用研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [35] Khoo, M.M., Ng, K.L., Alias, Y., *et al.* (2016) Impedimetric Biotin—Immunosensor with Excellent Analytical Performance for Real Sample Analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **934**, 180-185.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.048>
- [36] Lei, Y., Xie, F., Wang, W., *et al.* (2010) Suspended Nanoparticle Crystal (S-NPC): A Nanofluidics-Based, Electrical Read-Out Biosensor. *Lab on a Chip*, **10**, 2338-2340. <https://doi.org/10.1039/c004758a>
- [37] Huang, Z.J., Haugland, R.P., Szalecka, D., *et al.* (1992) A Simple and Sensitive Enzyme-Mediated Assay of Biotin. *BioTechniques*, **13**, 543-546.