

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Studium stability různých forem kreatinu užívaných v oblasti  
fitness**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce: Veronika Seidlerová

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

**Olomouc 2022**

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

Autor:	Veronika Seidlerová
Název práce:	Studium stability různých forem kreatinu užívaných v oblasti fitness
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého
Vedoucí práce:	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Anotace:	<p>Tato diplomová práce se zabývá studiem stability kreatinu, jednoho z nejznámějších suplementů na trhu sportovní výživy, který je využíván pro krátkodobé zvýšení svalového výkonu. Na tuto látku může být nahlíženo i z medikačních důvodů, kde její suplementace může zkvalitnit dobu života u starších jedinců, či může zmírnit průběh mnoha závažných onemocnění. Cílem práce je prozkoumat stabilitu pěti forem kreatinu pomocí HPLC-DAD analýzy ve čtyřech různých prostředích (vodě, roztoku podobného svým pH prostředí džusu, roztoku HCl stejné koncentrace jako je v žaludku a roztoku vody s citrulinem). Stabilita byla zkoumána v závislosti na odlišných kreatinových formách, na čase a na rozdílných hodnotách pH. Závěrem jsou tyto formy a použítá prostředí vzájemně porovnány.</p>
Klíčová slova:	kreatin, kreatinin, stabilita, formy kreatinu
Počet stran:	54
Počet příloh:	6
Jazyk:	Česky

## **BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION**

Author:	Veronika Seidlerová
Title:	Study of stability of various creatine form used in fitness
Type of thesis:	Diploma thesis
Department:	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
Supervisor:	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
The year of presentation:	2022
Annotation:	<p>This diploma thesis is on the study of the stability of creatine, one of the most well-known supplements on the sports nutrition market, which is used for short-term increase of muscle performance. This substance can also be viewed for medication reasons, where its supplementation can improve the quality of life of the elderly, or can change the course of many serious diseases. This work aims to analyze the stability of five forms of creatine by HPLC-DAD analysis in four different media (water, a solution with pH similar to a juice, a HCl solution of the same concentration as in the stomach, and water with citrulline). Stability is analyzed depending on different creatine forms, time, and different pH. Finally, these forms and media are compared.</p>
Keywords:	creatine, creatinine, stability, types of creatine
Number of pages:	54
Number of appendices:	6
Language:	Czech

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně s použitím pramenů, které uvádím v seznamu citované literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis studentky

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Srdečně děkuji mému vedoucímu závěrečné práce RNDr. Lukáši Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení během konzultací i práce v laboratoři, za jeho trpělivost, čas, ochotu, užitečné rady, a především za vstřícný a lidský přístup během celého mého studia.*

*Dále chci s láskou poděkovat mé rodině za umožnění studia, při kterém jsem po celou dobu cítila jejich podporu a upřímně děkuji za jejich trpělivost, laskavost a vstřícnost, kterou mi poskytovali každý den.*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
2.1	Kreatin .....	12
2.1.1	Biosyntéza a metabolismus kreatinu.....	12
2.1.2	Biologická dostupnost a transport kreatinu.....	16
2.1.3	Kreatinová suplementace .....	17
2.1.4	Využití v medicíně.....	18
2.2	Formy kreatinu .....	19
2.2.1	Kreatin monohydrát .....	20
2.2.2	Kre-Alkalyn.....	21
2.2.3	Kreatin ethyl ester.....	22
2.2.4	Kreatin hydrochlorid.....	23
2.2.5	Kreatin nitrát.....	23
2.2.6	Kreatin citrát.....	24
2.2.7	Kreatin malát .....	24
2.2.8	Kreatin pyruvát .....	25
2.3	Chemická analýza kreatinu a kreatininu.....	27
2.3.1	Fotometrie a spektrofotometrie.....	27
2.3.2	Infračervená spektroskopie.....	28
2.3.3	Kapalinová chromatografie .....	30
2.3.4	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií .....	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1	Chemikálie .....	34
3.2	Přístroje a pomůcky.....	35
3.2.1	Kapalinový chromatograf s UV a MS detekcí.....	35
3.3	Pracovní postup.....	36

3.3.1	Příprava roztoků.....	36
3.3.2	Odběr a příprava na měření .....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	41
5	ZÁVĚR .....	53
5.1	Summary .....	54
6	LITERATURA.....	55

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AGAT	L-arginin:glycin-amidino-transferáza
ATP	adenosintrifosfát
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CDS	syndrom nedostatku kreatinu
CK	kreatinkináza
GAA	kyselina guanidinoctová
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAMT	guanidinoacetátmethyltransferáza
GC-MS	plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetické rezonanční spektroskopie
PFPA	anhydrid kyseliny pentafluoropropionové
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
UV-VIS	ultrafialové a viditelné světlo



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec kreatinu .....	12
Obrázek 2: Biosyntéza kreatinu a kreatininu .....	13
Obrázek 3: Cyklus transportu kreatinu (Kr) a fosfokreatinu (Kr-P) mezi mitochondrií a cytosolem buňky; KrT – kreatinový transportér; mtCK – mitochondriální kreatinkináza; CK-a,c,g – cytosolová kreatinkináza; 1–4 – místa interakce kreatinkinázy/ATP [7] .....	14
Obrázek 4: Zacyklení a struktura kreatininu .....	15
Obrázek 5: Degradace kreatinu ve vodných roztocích v závislosti na pH a čase; A- při teplotě 25 °C; B - při teplotě 4 °C (převzato z cit. [8]) .....	16
Obrázek 6: Vznik kreatinové soli za pomoci silné kyseliny .....	20
Obrázek 7: Strukturní vzorec kreatin monohydrátu .....	21
Obrázek 8: Strukturní vzorec kreatin ethyl esteru .....	22
Obrázek 9: Strukturní vzorec kreatin hydrochloridu .....	23
Obrázek 10: Strukturní vzorec kreatin nitrátu .....	23
Obrázek 11: Strukturní vzorec kreatin citrátu .....	24
Obrázek 12: Strukturní vzorec kreatin malátu .....	25
Obrázek 13: Strukturní vzorec kreatin pyruvátu .....	25
Obrázek 14: Jaffého reakce (převzato z cit. [27]) .....	28
Obrázek 15: Infračervené spektrum kreatin monohydrátu .....	29
Obrázek 16: Fotografie všech použitých forem kreatinu (převzato ze stránek výrobců) .....	34
Obrázek 17: Schéma přípravy roztoků kreatinů .....	37
Obrázek 18: Rozpuštěný kreatin monohydrát ve všech prostředích .....	38
Obrázek 19: Rozpuštěný kre-alkalyn ve všech prostředích .....	38
Obrázek 20: Rozpuštěný kreatin ethyl ester ve všech prostředích .....	39
Obrázek 21: Rozpuštěný kreatin hydrochlorid ve všech prostředích .....	39
Obrázek 22: Rozpuštěný tri-kreatin malát ve všech prostředích .....	39
Obrázek 23: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v deionizované vodě v čase odběru 0, 24 a 168 h .....	42
Obrázek 24: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku pH „džusu“ v čase odběru 0, 24 a 168 h .....	43
Obrázek 25: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku pH „žaludku“ v čase odběru 0, 24 a 168 h .....	44

Obrázek 26: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku citrulinu v čase odběru 0, 24 a 168 h.....	45
Obrázek 27: Závislost plochy píků na čase formy kreatin monohydrátu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu .....	47
Obrázek 28: Chromatogramy kre-alkalynu rozpuštěného ve vodě v čase odběru 0, 24 a 168 h .....	48
Obrázek 29: Závislost plochy píků na čase formy kre-alkalynu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu .....	49
Obrázek 30: Závislost plochy píků na čase formy tri-kreatin malátu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu .....	51
Obrázek 31: Chromatogram kreatin ethyl esteru rozpuštěného ve vodě, odběr v čase 0; A: sériové měření všech kreatinů B: dodatečné změření stejného vzorku s časovým odstupem.....	52

# 1 ÚVOD

Ve světě sportovců, ať už rekreačních či profesionálních, patří kreatin k nejpoblárnějším a nejvíce prostudovaným doplňkům stravy. Jeho popularita může souviset s faktem, že se jedná o látku přirozeně se vyskytující v lidském organismu. Je velmi oblíbený pro svou hlavní funkci, kterou je krátkodobé doplnění energie do svalové tkáně. Tento efekt je velmi žádaný při silových a rychlostních trénincích (např. sprint), kdy je klasický příjem energie pro sval nedostačující z hlediska potřeby zvýšení jeho výkonu.

Na trhu existuje spousta kreatinových přípravků v různých formách, např. monohydrát, kre-alkalyn, ethyl ester, hydrochlorid, citrát, malát aj. Spektrum možností pro sportovce je velmi široké a firmy prodávají různé kombinace těchto forem v přípravcích s cílem zajistit a propagovat co nejvyšší a nejdelsí možnou účinnost. V důsledku oblíbenosti užívání tohoto supplementu je důležité prostudovat stabilitu a efektivitu novějších forem kreatinu, které bývají propagovány na trhu sportovní výživy.

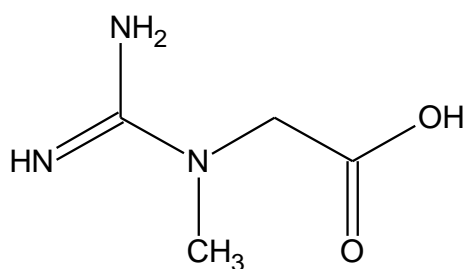
Cílem této práce je prozkoumat stabilitu různých forem kreatinu v různých prostředích, která jsou v praxi často v kontaktu právě s tímto supplementem. Nejčastěji bývají tyto produkty rozpuštěny ve vodě nebo v ovocných džusech, proto je v této práci použitý roztok vody, roztok vody s citrulinem, který bývá přidáván do směsných supplementů spolu s kreatinem a roztok podobný svým pH prostředí džusu. Posledním prozkoumaným prostředím je roztok simulující kyselé prostředí žaludku, aby byla prozkoumána celková stabilita jednotlivých produktů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kreatin

Tato biologická sloučenina byla poprvé objevena roku 1832 a v průběhu devatenáctého století byla detekována ve svalové tkáni různých savců. Proto byl její triviální název odvozen z řeckého slova kréas neboli maso. [1] Dnes se kreatin často řadí mezi neznámější a nejpobulárnější suplementy na trhu sportovní výživy.

Z chemického hlediska je kreatin znám jako N-(aminoiminomethyl)-N-methylglycin (Obrázek 1). V lidském organismu se tato sloučenina vyskytuje zcela přirozeně, kde vzniká ze třech biogenních (proteinogenních) aminokyselin – L-argininu, glycinu a L-methioninu. Syntetizuje se v ledvinách a játrech odkud se jeho převážná část transportuje (aktivním transportem) krví do svalové tkáně, která má vysokou spotřebu energie. Jelikož tato sloučenina dodává do svalové tkáně energii, stala se součástí předtréninkových suplementů pro podporu síly a výkonu při tréninku. Je ovšem důležité zmínit, že kreatin není vhodný pro jakékoliv vytrvalostní sporty. Supplementace je využívána především při krátkodobých intenzivních výkonech silových a rychlostních sportů. Je to z toho důvodu, že při intenzivním výkonu dochází ke spotřebě svalové energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) a kreatin spolupracuje s jejím rychlým obnovením při tréninku. [2,3]

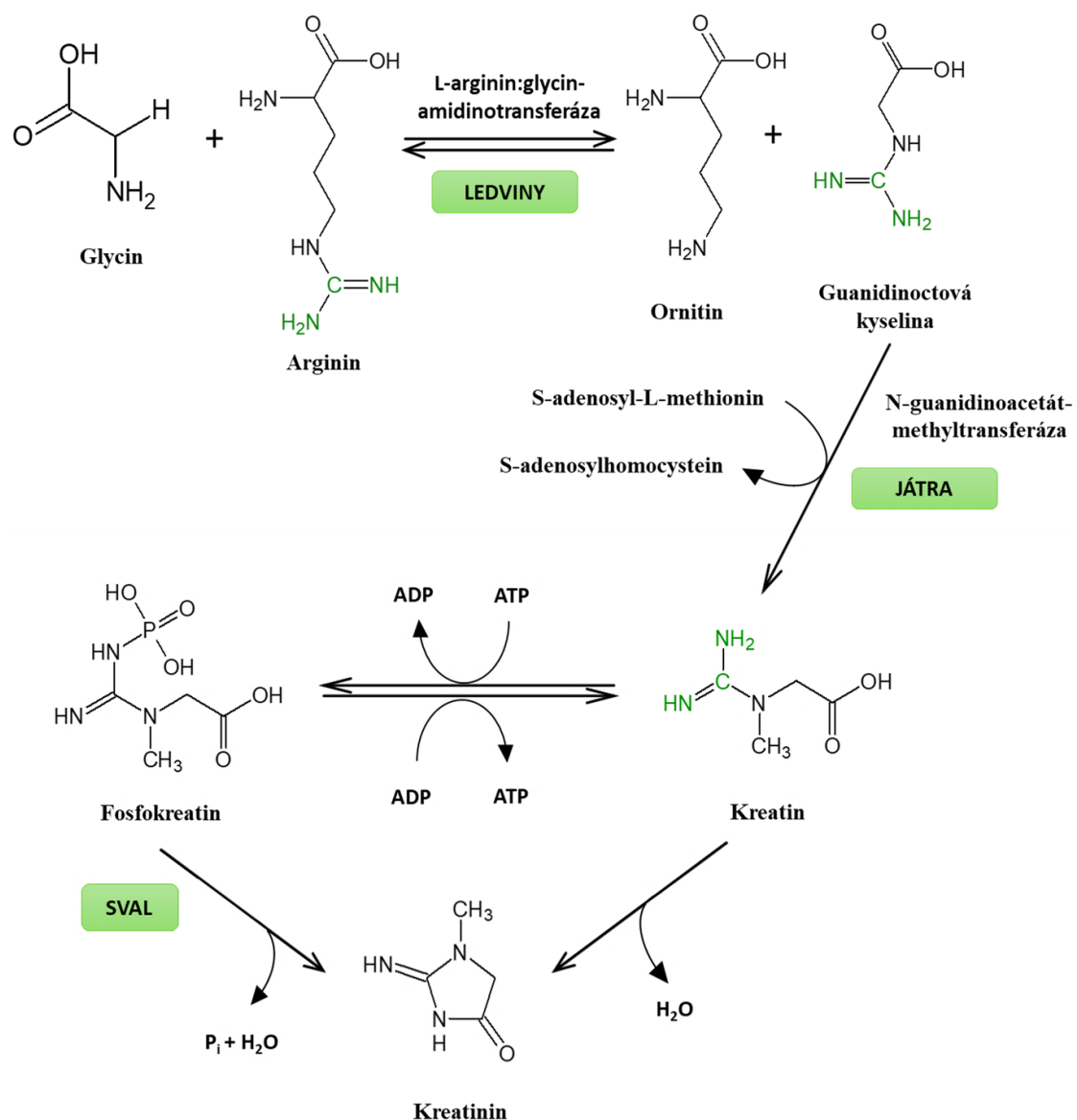


Obrázek 1: Strukturní vzorec kreatinu

#### 2.1.1 Biosyntéza a metabolismus kreatinu

Jak již bylo zmíněno, kreatin je tělu vlastní tripeptid a jeho syntéza (Obrázek 2) začíná v ledvinách reakcí, při které se amidová část aminokyseliny L-argininu naváže na glycin. Produkty této počáteční reakce jsou L-ornitin a kyselina guanidinoctová

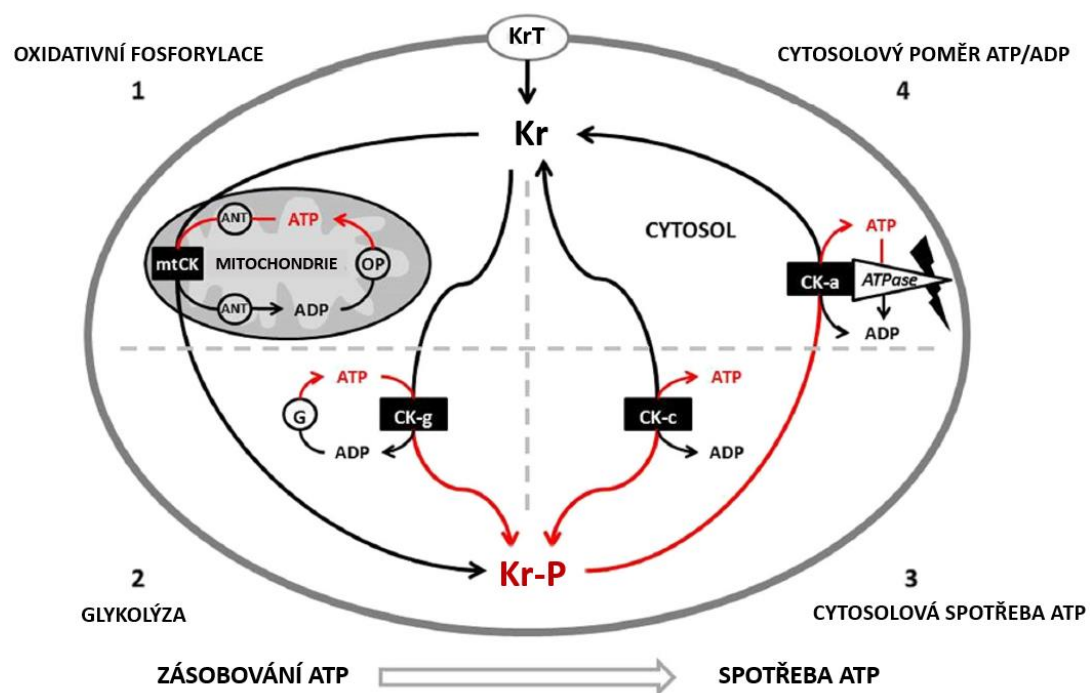
(GAA). Tato reakce je katalyzována enzymem L-arginin:glycin-amidino-transferázou (AGAT), který má vysokou aktivitu v ledvinách a pankreatu. Kyselina guanidinoctová syntetizovaná v ledvinách je následně transportována krví do jater, kde dochází k reakci s S-adenosyl-L-methioninem (SAM) za účasti guanidinoacetátmethyltransferázy (GAMT), což vede k metylaci GAA. Během této reakce se uvolňuje S-adenosylhomocystein (SAH). Výsledným produktem této reakce je kreatin, který je aktivně transportován z jater přes buněčnou membránu do krevního oběhu. Poté dochází k absorpci kreatinu z krve do jednotlivých tkání, např. svalu. U žen je míra syntézy kreatinu o 20-30 % nižší než u mužů. S procesem stárnutí se mění i rychlost syntézy, u jedinců ve věku mezi 20-39, 40-59 a nad 60 let je odhadována rychlost syntézy kreatinu přibližně 7,7; 5,6 a 3,7 mmol za den. [2,4]



Obrázek 2: Biosyntéza kreatinu a kreatininu

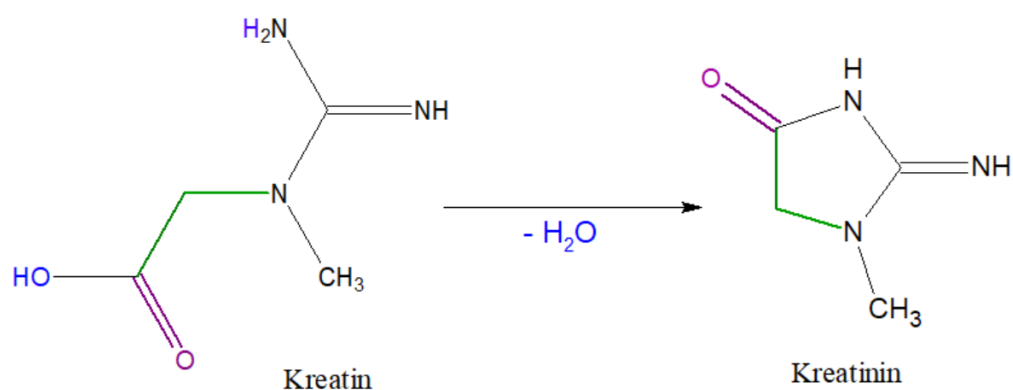
Po absorpci kreatinu svalovými buňkami dochází k jeho přeměně na fosfokreatin pomocí dvou důležitých látek – nejdůležitějšího přenašeče energie ATP a enzymu kreatinkinázy (CK), který katalyzuje tuto reakci. Tato reakce je reverzibilní, proto fosfokreatin svou fosfátovou skupinu opět vrací vzniklé molekule adenosinmonofosfátu (ADP) a dochází k resyntéze ATP. Během této reakce dochází k absorbování jednoho protonu, což znamená, že kreatin neutralizuje účinky svalové acidózy spojené s intenzivním tréninkem. Dostatečné množství kreatinu (i suplementovaného) zvýší buněčné zásoby fosfokreatinu, díky němuž dochází k rychlejší resyntéze ATP. ATP je hlavním zdrojem buněčné energie, proto tento děj umožňuje krátkodobě zvýšit dynamický rychlostní a silový výkon. Během svalového odpočinku je množství ATP obnoveno procesem oxidativní fosforylace a kreatin začne obnovovat zhruba 95 % fosfokreatinu během 3-4 minut. [2, 5, 6]

Kreatinkináza je klíčovým enzymem tohoto procesu a dělí se na dva typy – cytoplazmatickou (3 izofomy) a mitochondriální (2 izofomy). Tento fosfokreatinový systém hraje důležitou roli v oblasti přenosu energie z mitochondrií do cytosolu a celý proces je znázorněn na obrázku 3. [6,7]



Obrázek 3: Cyklus transportu kreatinu (Kr) a fosfokreatinu (Kr-P) mezi mitochondrií a cytosolem buňky; KrT – kreatinový transportér; mtCK – mitochondriální kreatinkináza; CK-a,c,g – cytosolová kreatinkináza; 1–4 – místa interakce kreatinkinázy/ATP [7]

Aby došlo k eliminaci kreatinu (fosfokreatinu) ze svalu, musí dojít k přeměně na molekulu kreatininu (Obrázek 2). Kreatinin vzniká ireverzibilní dehydratací a následně cyklizací kreatinu (fosfokreatinu). Jelikož jsou obě látky, kreatin a fosfokreatin, poměrně nestabilní molekuly, je tato přeměna neenzymatická, spontánní a kontinuální. Kreatinin (Obrázek 4) je transportován do krve a z těla se vylučuje močí. Množství vylučování kreatininu se odvíjí od několika faktorů – pohlaví, věku jedince a množství svalové hmoty. Vylučování kreatininu dosahuje maxima u osob ve věku 18-29 let se ztrátou přibližně 24 mg.kg<sup>-1</sup> během 24 hodin, s věkem se snižuje, například u osob ve věku 70-79 let míra vylučování klesá na přibližnou hodnotu 13 mg.kg<sup>-1</sup> za 24 hodin. U žen je přibližná míra vylučování o 20 % nižší než u mužů. [4]

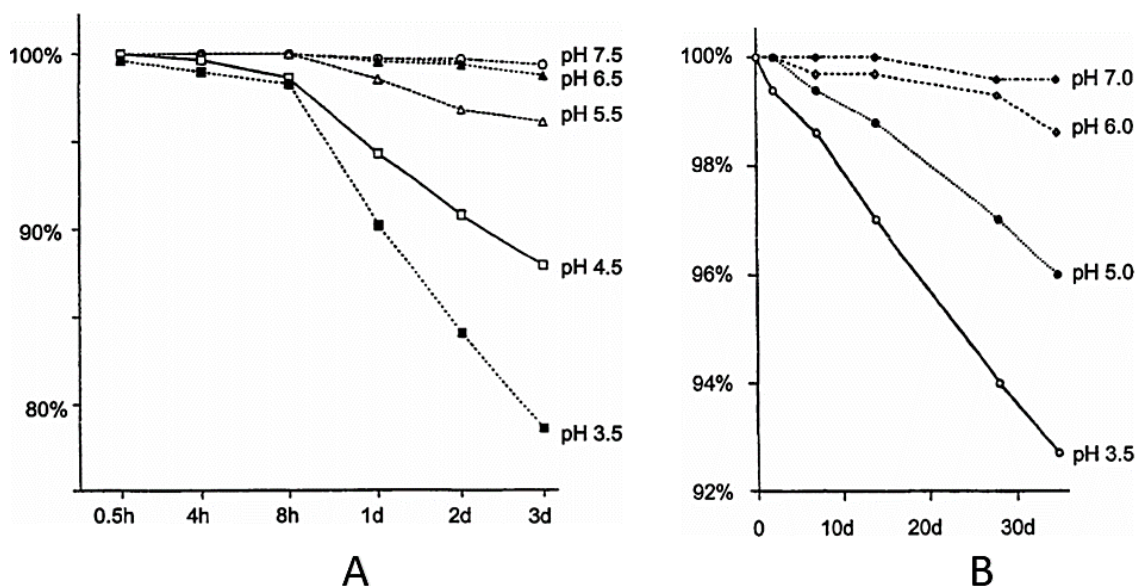


Obrázek 4: Zacyklení a struktura kreatininu

Samovolná přeměna kreatinu na kreatinin závisí na hodnotě pH a teplotě. Čím je vyšší teplota, tím je přeměna rychlejší. [2] Obecně bývá nejrychlejší přeměna kolem pH = 3,5. Degradaci kreatinu lze snížit nebo dokonce zastavit buď zvýšením pH nebo snížením pod 2,5. U velmi vysokého pH totiž dochází k deprotonaci kyselé skupiny a dochází ke ztížení intramolekulární cyklizace na kreatinin. Naopak nízké pH má za následek protonaci amidové skupiny kreatinu, která také brání intramolekulární cyklizaci. Z těchto informací vyplývá, že v žaludku (pH = 2), ani ve střevě (pH = 6-7) nedochází k významným přeměnám na kreatinin. [8, 9]

Autoři Howard a Harris v roce 1999 publikovali práci zabývající se poklesem koncentrace kreatinu ve vodných roztocích při různých hodnotách pH a při dvou různých teplotách: 25 °C (Obrázek 5A) a 4 °C (Obrázek 5B). Vzorčky byly upraveny na požadovanou hodnotu pH pomocí kyseliny octové a hydroxidu draselného. Ukázalo se, že při 25 °C je kreatin ve vodném roztoku nejvíce stabilní v bazickém pH, tedy

pH = 6,5-7,5 po dobu až 3 dnů, naopak při pH = 3,5 byl kreatin relativně stabilní pouze po dobu 8 h. Rozpad kreatinu pozorovaný po dobu 3 dnů při pH = 5,5; 4,5 a 3,5 byl 4%, 12% a 21%. Při teplotě 4 °C se přeměna kreatinu na kreatinin značně zpomalila, při pH = 3,5 byla koncentrace kreatinu v roztoku nad 90 % i po 30 dnech. [8]



Obrázek 5: Degradace kreatinu ve vodných roztocích v závislosti na pH a čase; A - při teplotě 25 °C; B - při teplotě 4 °C (převzato z cit. [8])

Svalové buňky ukládají až 95 % kreatinu, zatímco zbývajících 5 % je uchováváno v srdci, mozku a varlatech. Průměrný obsah kreatinu v těle u 70kg muže je kolem 120 g a jeho minimální spotřeba na den je zhruba 2 g, přičemž biosyntéza kreatinu pokryje zhruba polovinu této minimální denní spotřeby. Druhou polovinu dostaneme do organismu nejčastěji ve formě kvalitních živočišných bílkovin – masitá strava (např. hovězí, kuřecí, králičí maso a ryby). V masě je průměrná koncentrace kreatinu od 4 do 5 g.kg<sup>-1</sup> masa, u ryb se pohybuje v rozmezí 4-10 g.kg<sup>-1</sup>. U vegetariánů a veganů je syntéza kreatinu značně nedostačující ve srovnání s konzumenty živočišných bílkovin a vede ke snížení hladiny kreatinu ve svalech. U těchto alternativních stravovacích návyků by měl být hlídán dostatečný příjem aminokyselin, včetně těch, které se přímo podílejí na syntéze kreatinu. [2–5]

## 2.1.2 Biologická dostupnost a transport kreatinu

Celkový příjem kreatinu do krevního řečiště závisí na biologické dostupnosti všech přijatých forem kreatinu. Tato biologická dostupnost je často snížena díky několika



faktorům – 1) nedostatečnou rozpustností kreatinu při perorálním požití, 2) degradací kreatinu na kreatinin v žaludku a trávicí soustavě, 3) zvýšením vylučování kreatinu stolicí po perorálním podání a 4) degradací kreatinu střevní flórou. Nejlepší, 99% biologickou dostupnost vykazuje kreatin ve formě roztoku a z masa, i když je absorpce kreatinu z masa pomalejší než z roztoku. Před užitím je vždy klíčové, aby byl suplement kreatinu (prášek, tablety, tobolky...) zcela rozpustný. U tablet bývá biologická dostupnost omezenější, díky procesu dezintegrace a následnému rozpuštění, oproti suspenzi, kde musí dojít pouze k rozpuštění suspendovaných částic. Aby byla stanovena přesná biologická dostupnost, musí se určit hladiny kreatinu ve svalových buňkách před a po suplementaci pomocí svalové biopsie. [2, 10]

Absorpci a transport kreatinu ze střevní tkáně zajišťují kreatinové transportéry. Kreatin je transportován do kosterních svalů proti vysokému koncentračnímu gradientu, jelikož je koncentrace kreatinu v krvi v rozmezí 50-100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , zatímco koncentrace v kosterním svalstvu je 5-10  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Tento transportér je závislý na molekule chloridu sodného a k transportu jedné molekuly kreatinu vyžaduje dva sodíkové a jeden chloridový ion. Strukturou se podobá transportérům dopaminu nebo GABA. Funkce tohoto transportéru je ovlivněna několika faktory, jako inzulínem, obsahem kreatinu ve svalech a náročností cvičení. [2–5]

Obecně platí, že ne všechny přijaté kreatin bude zadržen v těle v okamžiku jeho absorpce, zejména pokud jsou užívány vysoké dávky kreatinu. Vysoká míra kreatinu v těle bývá zachována v počátcích suplementace, ale s postupem času dochází ke zvyšování vylučování kreatinu do moči. Důvodem této degradace je, že během suplementace je ve svalech přítomno méně receptorů kreatinových transportérů. Tento vliv na receptory kreatinových transportérů je nejspíše jedním z důvodů, proč je často zmiňováno, že existuje maximální množství kreatinu uloženého v kosterních svalech. Jedná se ovšem o reverzibilní účinek, který skončí po ukončení suplementace.[1]

### **2.1.3 Kreatinová suplementace**

Mezi další důležité faktory ovlivňující výsledný výkon se vedle biologické dostupnosti řadí i vhodný plán suplementace kreatinem, který je nastaven systémem tří fází. Tou první fází je fáze zaváděcí (nasyčovací), ve které by mělo být konzumováno v průměru 0,3 g kreatinu na kilogram váhy jedince každý den. Obecně je doporučováno

si každou denní dávku rozdělit do pětigramových porcí s tím, že jedna dávka by měla být užitá 30 min před tréninkem a další 4-6 hodin po tréninku. Tato fáze trvá týden a poté se přechází do fáze udržovací. Udržovací fáze trvá čtyři týdny a konzumovaná dávka kreatinu se snižuje v průměru na 0,1 g na kilogram váhy každý den, přičemž v necvičící dny je kreatin užíván ráno se snídaní a večer s večeří. Poslední fází je regenerační fáze, během které se kreatin neužívá, trvá až 3 týdny a záleží pouze na každém jedinci, zda bude dávkování vynecháno, jelikož dávka kolem dvou gramů kreatinů za den může být konzumována nepřetržitě. Tento cyklus suplementace může být bezpočetně opakován podle potřeb jedince. [3, 11]

Obecně platí, že by se kreatin měl užívat spolu s rychle stravitelnými cukry, které se vyznačují vysokým glykemickým indexem. Bylo zjištěno, že obsažený cukr napomáhá inzulínové reakci, která pomáhá zvýšit absorpci kreatinu dokonce až o 60 %. Vhodnými cukry jsou například glukóza, maltóza nebo dextróza. Dodržení tohoto doporučení je důležitější zejména v počátcích kreatinové suplementace, jelikož zásoby kreatinu ve svalích bývají nižší. Častým zvykem u konzumentů je míchání kreatinu s ovocnými šťávami obsahující převážně fruktózu, která se do skupiny rychle stravitelných cukrů neřadí. Jinými slovy, samotná fruktóza nezpůsobí rapidní nárůst hladiny inzulínu a nedochází tedy ke zvýšení saturace kreatinu do svalů. V neposlední řadě je rizikem u některých ovocných šťáv obsah kyselin, které mohou narušit aktivitu kreatinu konverzí na kreatinin a rychleji jej degradovat. Tyto informace jsou obecně známé, existuje ovšem mnoho forem kreatinu a některé mohou mít lehce odlišné požadavky, aby docházelo k maximálnímu vstřebání kreatinu. [5, 11]

#### **2.1.4 Využití v medicíně**

Jak je zmíněno v předchozích podkapitolách, kreatin je celosvětově vnímán jako důležitý suplement pro sportovce. Bylo však objeveno jeho další využití, kdy kreatin může pomoci s prevencí nebo oddálením neurodegenerativních onemocnění, které bývají spojovány s procesem stárnutí. Ve věku kolem 80 let dochází totiž k poklesu zhruba 30 % svalové hmoty a svalová slabost zůstává dodnes zásadní příčinou ztráty nezávislosti u starší populace. Byla provedena studie, kdy byl starším jedincům suplementován kreatin a docházelo ke sledování navyšujících se hladin kreatinu, který měl příznivý účinek na svalovou hmotu seniorů. Závěrem byla logická úvaha o transportu kreatinu. Pokud došlo ke zvýšení kreatinu ve svalové tkáni, mohlo dojít i k transportu kreatinu

pomocí kreatinových transportérů přes hematoencefalickou bariéru do mozkové tkáně, kde se endogenní hladiny kreatinu s přibývajícím věkem snižují. [12]

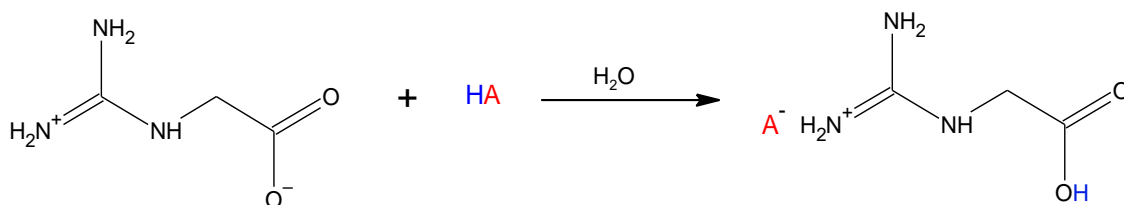
V souvislosti s mozkovými funkcemi bylo prokázáno, že kreatin vykazuje antioxidační vlastnosti, snižuje duševní únavu, chrání mozek před neurotoxicitou a je schopen zmírnit průběh neurologických poruch, jako je deprese, nebo bipolární porucha. Kreatin se tedy stal alternativním předním kandidátem v boji proti nemocem souvisejícím se stárnutím organismu, jako je například Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, nebo proti poruchám dlouhodobé paměti spojené s rozvojem Alzheimerovy choroby a mrtvice. [13]

Může-li suplementace kreatinu pomoci zkvalitnit dobu života během stárnutí, je otázkou, jak může ovlivnit proces růstu plodu v těhotenství, či miminka po narození. Autoři H. Dickinson a kol. (2014) se právě na toto vývojové období zaměřili ve své studii. Těhotenství je stavem zvýšené metabolické aktivity se zvýšenými nutričními požadavky na matku, a i ve správném vývoji plodu dochází k vyšší tvorbě volných radikálů kyslíku a dusíku, jejichž klíčovým zdrojem je placenta. Fetální (plodové) tkáně, včetně vyvíjecího mozku, jsou zranitelné vůči oxidačnímu stresu, zejména pokud je přítomna infekce, nebo zánětlivé procesy. Dalším faktem je, že hladké svalstvo dělohy obsahuje nízké hladiny kreatinu a ATP a přítomný fosfokreatin se snadno vyčerpá děložní činností během porodu. Doplněný kreatin může předcházet nemocem vyvolané svalovou atrofií, zlepšuje rehabilitaci, obecně posiluje buněčnou energetiku a reguluje oxidační stres. Obecně pomáhá zabránit mnoha porodním i poporodním komplikacím – předčasnému porodu, hypoxicko-ischemické encefalopatii (možnost poškození centrální nervové soustavy), preeklampsie, nebo zabránit vzniku hypoxie. [14] Na kreatinovou suplementaci, ať už v těhotenství či stáří by po důkladnějším lékařském výzkumu mohlo být nahlíženo jako na možnou preventivní léčbu, nebo jako na doplněk ke konvenční medikaci, který může v první řadě pomoci v prevenci všech výše zmíněných onemocnění.

## 2.2 Formy kreatinu

V dnešní době existuje na trhu zhruba 18 forem kreatinů. Jsou k dostání v samostatných formách, nebo jsou součástí různých stimulantů a anabolizérů. Z chemického hlediska se dají rozdělit na kreatinové soli, deriváty a okrajově kreatinové alkoholy. Jelikož je kreatin slabou bází s hodnotou  $pK_B = 11,2$  (při teplotě 25 °C), kreatin

může tvořit soli pouze se silnými kyselinami mající hodnoty  $pK_A$  nižší než 3,98. Soli jsou tvořeny protonací guanidinové skupiny kreatinu (Obrázek 6) a vznikají látky typu kreatin citrát, malát, fumarát aj.. Obecně platí, že rozpustnost kreatinu lze zvýšit snížením pH. [5]

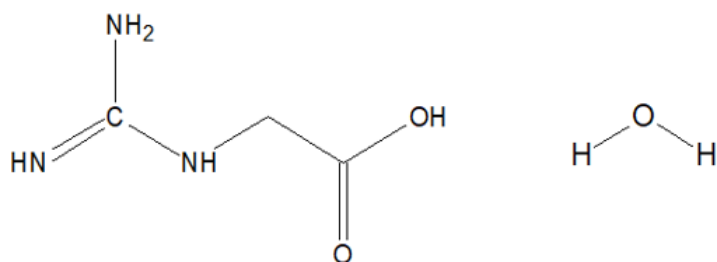


Obrázek 6: Vznik kreatinové soli za pomoci silné kyseliny

Další skupinou jsou deriváty a kreatinové alkoholy, které neobsahují v chemické struktuře kompletní kreatin. U těchto forem se předpokládá, že v lidském organismu podléhají přeměně na komplexní molekulu „čistého“ kreatinu. V této podkapitole budou představeny různé formy kreatinu, které běžně bývají srovnávány s nejčastější a nejprozkoumanější formou na trhu, kreatin monohydrátem. [5]

### 2.2.1 Kreatin monohydrát

Kreatin monohydrát je tou nejzákladnější formou a bývá i nejčastější volbou vědeckých studií. Tento název je odvozen od chemické struktury, kde na každou jednu molekulu kreatinu je navázána jedna molekula vody (Obrázek 7). Tato forma se vyznačuje dobrou absorpcí ve střevě a neprokazují se u ní žádné větší vedlejší účinky. Rozpustnost monohydrátu se uvádí  $14 \text{ g.l}^{-1}$  při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  a zvyšuje se s teplotou, např. při zahřátí na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  je rozpustnost  $45 \text{ g.l}^{-1}$ . Kreatin monohydrát je velmi stabilní prášek, který nevykazuje žádné známky degradace v průběhu let, a to ani při zvýšených teplotách ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Autoři Jäger a kol. (2003) sledovali obsah kreatininu v prášku kreatin monohydrátu, který kvantifikovali pomocí techniky HPLC a ani po třech letech a zvýšené teplotě  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  nevykazoval kreatin monohydrát známky degradace. Teprve po uplynutí 44 měsíců byl kreatinin detekován, a to v minimálním množství ( $106 \text{ ppm}$ ). [5, 15]



Obrázek 7: Strukturální vzorec kreatin monohydrátu

Kreatin monohydrát se vyskytuje ve dvou základních formách. V první formě je z kreatinu odebrán monohydrát sušením zhruba při 100 °C, vzniká tedy bezvodý kreatin, který díky vyloučení monohydrátu disponuje větší koncentrací kreatinu v jedné dávce. Jeho vlastnosti a účinky jsou ovšem totožné s monohydrátem, jelikož při kontaktu s vodným prostředím dochází opět k navázání vody. Druhým typem je mikronizovaný kreatin, který bývá na trhu přítomen pod označením Creapure zajišťující výrobek farmaceutické kvality. Tento mikronizovaný kreatin prochází procesem zmenšení rozměru částic kreatinu, dochází tedy ke zvýšení rozpustnosti. Pokud tento typ kreatinu nemá označení Creapure, je doporučováno zjistit jeho původ, aby byl suplement dostatečně kvalitní. [5]

### 2.2.2 Kre-Alkalyn

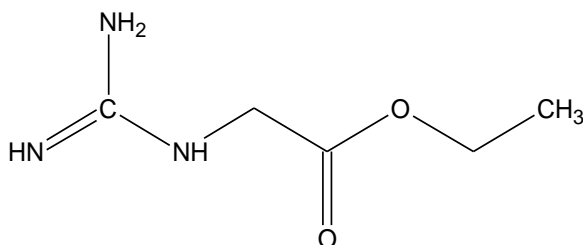
Kre-Alkalyn (buffered creatine) je formou, která se vyznačuje umělým zvýšením pH přidáním alkalického prášku, například smícháním kreatinu s hydrogenuhličitanem (uhličitanem) sodným, nebo fosforečnanem hořečnatým. Tato pufovaná forma se pohybuje v rozmezí pH = 7-14, nejčastěji se však vyskytuje kolem pH = 12. Takto upravený kreatin má zajistit větší stabilitu v žaludku, vyšší biologickou dostupnost a větší akumulaci ve svalové tkáni. [5, 16]

Autoři A. Jagim a kol. (2012) ve své studii porovnali účinky kreatin monohydrátu a Kre-Alkalynu u 36 sportovců po dobu 28 dní, kde každému byl náhodně přidělen jiný typ kreatinu. Byly dodrženy dávky doporučené výrobcem, u kreatin monohydrátu byla prvních sedm dní dodržena nasycovací fáze (4 × 5 g/den po dobu 7 dní) a poté byly suplementovány udržovací dávky 5 g/den pod dobu zbylých 21 dnů. U Kre-Alkalynu byla podle výrobce doporučena dávka 1,5 g/den. Výsledky svalové biopsie, krevního obrazu a Wingate anaerobního testu prokázaly, že u Kre-alkalynu nedocházelo k většímu

nahromadění kreatinu ve svalu v porovnání s kreatin monohydrátem. Tato studie vyloučila, že je Kre-alkalyn účinnější formou než kreatin monohydrát. [16]

### 2.2.3 Kreatin ethyl ester

Kreatin ethyl ester (Obrázek 8) je příkladem derivátu kreatinu, který ovšem vykazuje malou účinnost v porovnání s kreatin monohydrátem. Tato forma se při nízkém pH, tedy i v prostředí podobající se trávicímu traktu, samovolně přeměňuje na kreatinin. Poločas rozpadu kreatin ethyl esteru v krvi trvá do jedné minuty a tato hydrolyza je velmi rychlá na to, aby se kreatin dostal do svalových buněk. I přes tento fakt výrobci tvrdí, že se jedná o efektivní formu kreatinu. [5, 17]

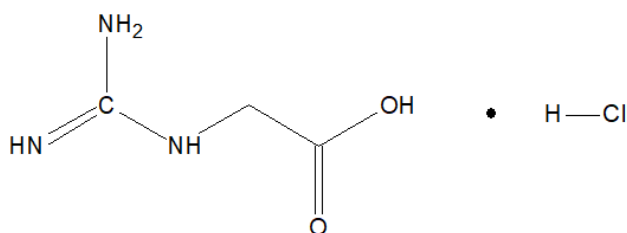


Obrázek 8: Strukturní vzorec kreatin ethyl esteru

Aby byla účinnost kreatin ethyl esteru dostatečně prozkoumaná, autoři M. Spillane a kol. (2009) provedli studii, kde účastníky rozdělili do třech skupin a suplementovali jim placebo maltodextrin, kreatin monohydrát a kreatin ethyl ester až po dobu 48 dnů. Během časové závislosti sledovali autoři změny tělesné skladby, změny obsahu vody, navýšení síly a hladiny kreatininu. Výsledky krevních, zátěžových testů a analýzy na přístroji DEXA (přesné měření tělesného složení a hustoty kostí) poukázaly na několik skutečností. Zaprvé kreatin ethyl ester nezvýšil významně hladinu kreatinu ve svalech v porovnání s kreatin monohydrátem i placebem. Dále i nárůst tělesné vody při suplementaci ethyl esterem byl shodný v porovnání s kreatin monohydrátem. V neposlední řadě suplementace kreatin ethyl esterem vykazovala vysoké hladiny kreatininu ve srovnání s kreatin monohydrátem. Z této informace je patrné, že velká část kreatin ethyl esteru byla degradována v gastrointestinálním traktu. Zlepšení sledovaných parametrů jako zlepšení tělesné skladby, obsahu vody a síly lze přisuzovat spíše kvalitnímu tréninkovému plánu, který dodržovaly všechny skupiny než suplementací kreatin ethyl esterem. [17]

## 2.2.4 Kreatin hydrochlorid

Kreatin hydrochlorid (Obrázek 9) je formou kreatinu, která v porovnání s kreatin monohdrátem přináší až čtyřicetinásobně vyšší rozpustnost a nižší doporučené denní dávkování 3 g/den. Dále by tato forma měla vykazovat větší možnou biologickou dostupnost. [18]

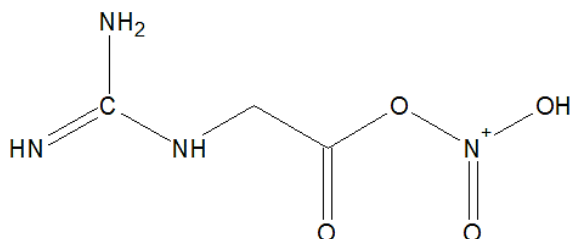


Obrázek 9: Strukturní vzorec kreatin hydrochloridu

I tato forma byla porovnána s kreatin monohdrátem, konkrétně ve studii M. Tayebi a H. Arazi (2019). Třiceti šesti sportovcům byly během tréninku suplementovány doporučené dávky kreatin monohdrátu, hydrochloridu nebo placebo po dobu 7 dnů. Výsledky zjištěné pomocí několika sportovních a krevních testů prokázaly, že kreatin hydrochlorid neposkytuje významný rozdíl v účinku na vitalitu a sílu oproti monohdrátu. [18]

## 2.2.5 Kreatin nitrát

Kreatin nitrát (Obrázek 10) je formou, v níž je na kreatin navázána nitrátová skupina, která zajišťuje lepší rozpustnost kreatinu. Další výhodou u této formy je požití dusičnanů, které snižuje kyslíkovou spotřebu při cvičení. [19]



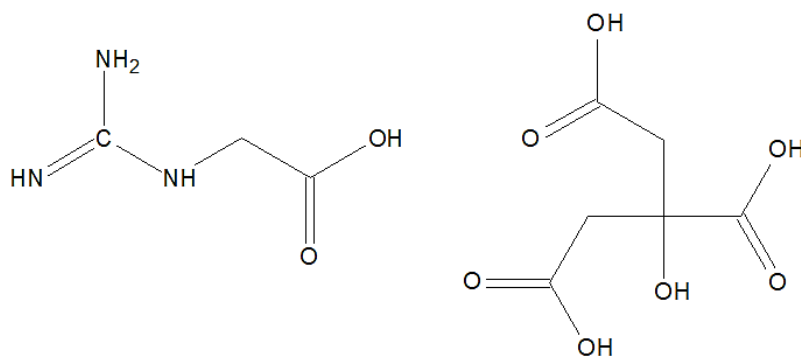
Obrázek 10: Strukturní vzorec kreatin nitrátu

Autoři E. Galvan a kol. (2016) zkoumali dvě látky kreatin a nitrát v kombinaci za předpokladu jejich synergického působení a následně tuto vzniklou kombinovanou formu kreatin nitrát srovnali s kreatin monohdrátem. Suplementaci kreatin nitrátu

nastavili do dvou typů dávkování, 1,5 g a 3 g/den a během suplementace zkoumali počet i intenzitu vedlejších účinků. Prokázalo se, že dávka 3 g byla velmi dobře tolerována a vykazovala podobné účinky jako kreatin monohydrát při stejném dávkování 3 g. Během této studie nebyla objevena žádná bezpečnostní rizika při požívání kreatin nitrátu. [19]

### 2.2.6 Kreatin citrát

Kreatin citrát je složen z kreatinu a kyseliny citronové (Obrázek 11). Přesněji se jedná o tri-kreatin citrát, kde jsou na jednu molekulu citrátu navázány tři molekuly kreatinu. Rozpustnost kreatin citrátu při teplotě 20 °C je 29 g.l<sup>-1</sup> a vykazuje tedy 1,55 krát vyšší rozpustnost ve srovnání s kreatin monohydrátem. Díky kombinaci s citrátem by měla tato forma zajistit lepší regeneraci, tato informace ovšem není prokázána. [15]

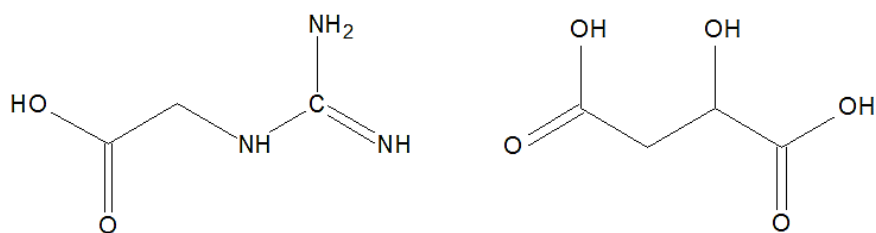


Obrázek 11: Strukturální vzorec kreatin citrátu

### 2.2.7 Kreatin malát

Jedná se formu, kde je molekula kreatinu navázána na kyselinu jablečnou (Obrázek 12) a vyznačuje se tak lepší rozpustností ve vodě v porovnání s kreatin monohydrátem. Stejně jako u tri-kreatin citrátu, jsou i tady na jednu molekulu malátu navázány tři molekuly kreatinu. V trávicím traktu se přeměňuje na kreatin monohydrát a kyselinu jablečnou. Díky kyselině jablečné, která je jedním z mezistupňů Krebsova cyklu, má kreatin malát dodávat rychleji energii do svalů. [5, 20]

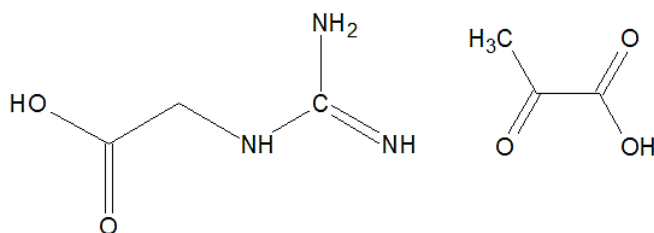




Obrázek 12: Strukturní vzorec kreatin malátu

## 2.2.8 Kreatin pyruvát

Kreatin pyruvát neboli kreatin 2-oxopropanoát (Obrázek 13) se vyznačuje vysokou rozpustností  $54 \text{ g.l}^{-1}$  při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  oproti kreatin monohydrátu. Kombinace kreatinu s kyselinou pyrohroznovou představila teorii, že by tato forma mohla pomoci při vysoce intenzivním i při vytrvalostním sportu, jelikož příjem vysokých dávek pyruvátu spolu s dihydroxyacetonem pozitivně ovlivní vytrvalostní kapacitu. Pokud je kreatin pyruvát dodáván v nízkých dávkách a v krátkodobé suplementaci, nezvyšuje vytrvalostní výkon. Bylo však zjištěno, že dlouhodobá suplementace této formy ( $6 \text{ g/den}$  po dobu 28 dnů) zvyšuje koncentraci pyruvátu o 60 %. Pyruvát je produktem procesu glykolýzy v lidském organismu a jeho velká část je transportována do mitochondrií, kde dochází k tvorbě ATP procesem oxidativní fosforylace. Dalším důležitým přínosem pyruvátu v lidském těle je možnost převedení pyruvátu na oxaloacetát, který je součástí Krebsova cyklu a těmito metabolickými pochody dochází ke zvýšení energie. [21–24]



Obrázek 13: Strukturní vzorec kreatin pyruvátu

Autoři R. Jäger a kol. (2007) porovnávali koncentraci izomolárního množství kreatin monohydrátu, tri-kreatin citrátu a pyruvátu v plazmě u šesti účastníků. Kreatin byl oxidován pomocí NADH a byl v plazmových extraktech detekován fotometricky při  $340 \text{ nm}$  s přítomností třech enzymů, kreatinkinázy, pyruvátkinázy a laktátdehydrogenázy. Kreatin pyruvát byl detekován stejným postupem, ale pouze s přidávkem laktátdehydrogenázy. Pouze v této studii dosáhl kreatin pyruvát nejvyšší

hladiny kreatinu v plazmě oproti výše zmíněným formám kreatinu. Tato studie naznačuje, že rozdílné formy mohou změnit kinetiku absorpce kreatinu v plazmě, nicméně jsou velmi nepravděpodobné rozdíly v biologické dostupnosti. Dále bylo zjištěno, že rozdíly v kinetice nemají významný vliv na zvýšení svalového kreatinu během jeho suplementace a nebyly zaznamenány žádné odlišnosti v absorpci jednotlivých forem oproti kreatin monohydrátu. [5, 22]

Všechny výše zmíněné formy řadíme k nejnázve dostupným formám, existuje ovšem mnoho dalších připravovaných a prodávaných forem kreatinu. V tabulce I je shrnutý jejich výčet i s procentuálním podílem kreatinu a procentuálním rozdílem oproti kreatin monohydrátu.

Tabulka I: Přehled různých forem kreatinu, jejich procentuální podíl kreatinu a rozdíl oproti kreatin monohydrátu. [15]

Forma kreatinu	Podíl kreatinu [%]	Rozdíl množství kreatinu oproti kreatin monohydrátu [%]
Bezvodý kreatin	100,0	13,8
Kreatin monohydrát	87,9	0,0
Kreatin ethyl ester	82,4	-6,3
Kreatin malát (3:1)	74,7	-15,0
Kreatin methyl ester HCl	72,2	-17,9
Kreatin citrát (3:1)	66,0	-24,9
Kreatin malát (2:1)	66,0	-24,9
Kreatin pyruvát	60,0	-31,7
Kreatin $\alpha$ -aminobutyrate	56,2	-36,0
Kreatin $\alpha$ -ketoglutarát	53,8	-38,8
Kreatinfosfát sodný	51,4	-41,5
Kreatin taurinát	51,4	-41,6
Kreatin pyroglutamát	50,6	-42,4
Kreatin ketoisokaproát	50,4	-42,7
Kreatin orotát (3:1)	45,8	-47,9
Karnitin kreatinát	44,9	-49,0
Kreatin dekanoát	43,4	-50,7
Kreatin glukonát	40,2	-54,3

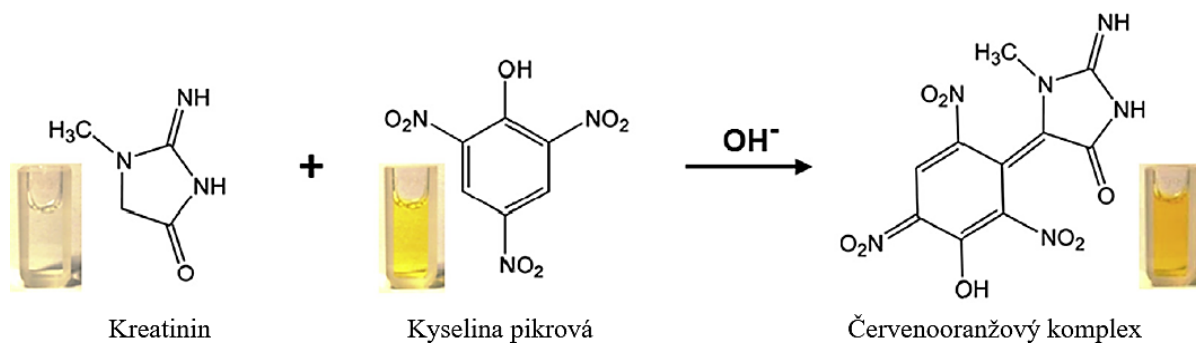
## 2.3 Chemická analýza kreatinu a kreatininu

První analytickou metodou, která byla v minulosti využita pro stanovení kreatinu, je klasická gravimetrická analýza fungující na principu vzniku nerozpustné sraženiny kreatinu, následném vysušení a zvažení. Postupem času byl ale kladen nárok na detekci stále nižších koncentrací a byly zavedeny postupy spektrometrických technik, např. fotometrie, infračervené spektrometrie, nebo nukleární magnetické rezonanční spektroskopie (NMR). Tyto metody jsou stále využívány nejčastěji v kombinaci se separačními technikami, například kapalinovou chromatografií. Další často používanou metodou je plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Mimo tyto zmíněné analýzy jsou často využívány i enzymatické analýzy. Pro přehlednost jsou zmíněné chemické metody popsány podrobněji v následujících podkapitolách. [25]

### 2.3.1 Fotometrie a spektrofotometrie

Fotometrie je nedestruktivní metoda založená na principu vzniku barevného produktu po reakci roztoku analytu a vhodně zvoleného činidla, kdy intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná koncentraci analytu. Měří se zde absorbance při konkrétních vlnových délkách ve viditelné oblasti spektra (400 – 750 nm) pomocí fotometrů. [26]

Základní metodou pro stanovení kreatinu i kreatininu je Folinova metoda vycházející z Jaffého reakce. Aby byla tato metoda provedena, dochází v prvním kroku k přeměnění kreatinu na kreatinin. Kreatin se chová jako slabá báze a přidáním kyseliny do roztoku (např. pomocí kyseliny chlorovodíkové) dojde k této změně. Poté reaguje vzniklý kreatinin s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku červenooranžového komplexu (Obrázek 14). Toto zbarvení je často detekováno fotometricky a jeho intenzita je změřena při vlnové délce kolem 500 nm. Tato metoda ovšem není příliš specifická, neboť kyselina pikrová reaguje s dalšími přítomnými organickými látkami v biologických tekutinách (pyruvát, acetát, glukóza, kyselina askorbová aj.). Hlavním benefitem je ovšem její rozšířenost a v praxi je běžně používaná k analýze kreatinu i kreatininu v biologických vzorcích, nejčastěji v moči nebo v krevním séru. [25, 27]



Obrázek 14: Jaffého reakce (převzato z cit. [27])

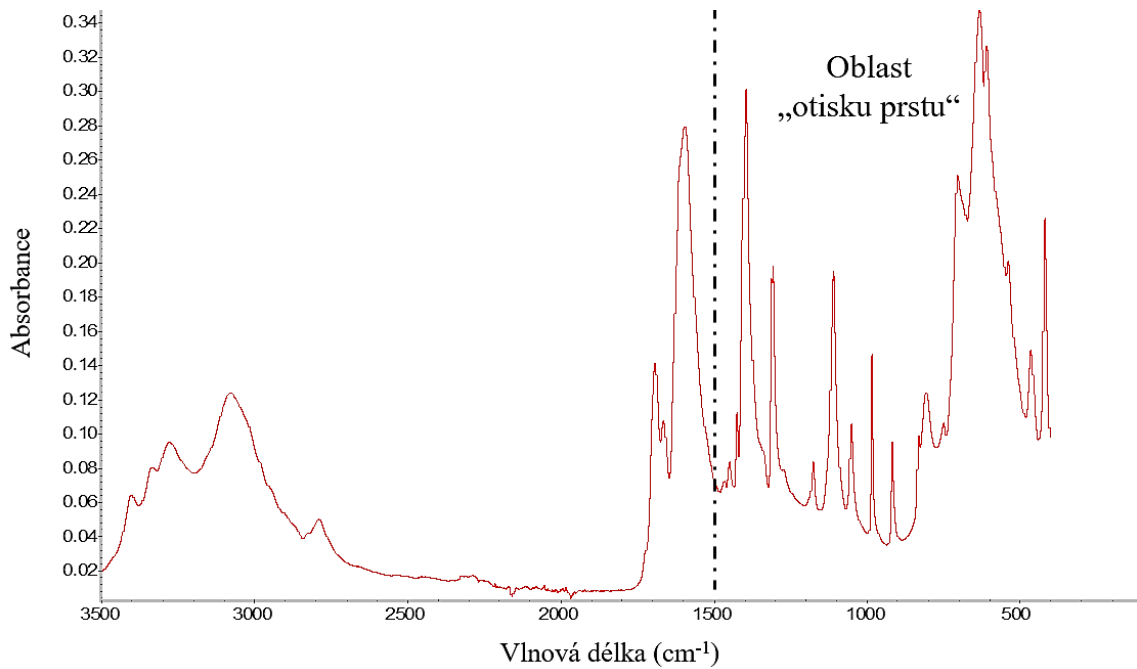
Je-li roztok analytu měřen v určitém souvislém rozmezí vlnových délek, jedná se o spektrofotometrii. Tuto techniku využili například autoři A. Krishnegowda a kol. (2013) ve studii stanovení kreatininu v krevním séru. Metoda je založena na principu oxidace kreatininu s p-methylaminosulfátem v přítomnosti síranu měďnatého poskytující intenzivní fialové zbarvení. Autoři měřili v rozsahu 400-700 nm, ovšem maximální absorpance byla přítomna ve viditelné oblasti světla 530 nm. Zvolené činidlo p-methylaminosulfát je snadno rozpustné ve vodě, není finančně nákladné a jeho toxicita je nižší ve srovnání s aromatickými rozpouštědly, které se běžně používají pro stanovení kreatininu. Další výhodou této metody jsou nízké limity detekce  $\text{LOD} = 0,15 \mu\text{M}$  a kvantifikace  $\text{LOQ} = 0,5 \mu\text{M}$ , metoda vykazuje dobrou citlivost, reprodukovatelnost, přesnost a nezávislost vůči matici. Velkou výhodou oproti Jaffého reakci je potlačení vlivu interferujících látek, obecně se tedy jedná o selektivnější metodu. [28]

Často jsou pro stanovení kreatininu používány aromatické organické látky (například kyselina 3,5-dinitrobenzoová), směsi enzymů, ale existují i postupy využívající agregace nanočástic stříbra. [29] Například studie S. Mohammadi a kol. (2015) popisuje rychlou, selektivní, citlivou a validovanou metodu kombinující spektrofotometrickou a kolorimetrickou analýzu pro stanovení kreatininu jak v moči, tak v krevním séru. [30] Z této podkapitoly je patrné, že dostupné studie využívající spektrofotometrické techniky jsou zaměřeny spíše pro stanovení kreatininu než kreatinu samotného.

### 2.3.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je nedestruktivní analytickou technikou, která nabízí možnost stanovení samotného kreatinu. Tato technika je založena na interakci

infračerveného záření s molekulami analytu, při níž dochází k absorpci záření vyvolávající přechod molekuly do vyšších vibračních nebo rotačních stavů. Pohybuje se ve spektrální oblasti v rozmezí  $5000-100\text{ cm}^{-1}$  ( $2000-100\,000\text{ nm}$ ). Výstupem je infračervené spektrum, které obsahuje absorpční pásy pro různé funkční skupiny včetně oblasti otisku prstu „fingerprint“, která je charakteristická pro každou látku a je přítomna v oblasti  $1500-500\text{ cm}^{-1}$ . [26] Obrázek 15 názorně zobrazuje infračervené spektrum nejznámější formy kreatinu, kreatin monohydrátu.



Obrázek 15: Infračervené spektrum kreatin monohydrátu

Autoři D. P. Jerônimo a kol. (2012) publikovali metodu stanovení kreatinu ve svalové tkáni u potkanů pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR). Potkanům byla podávána dávka 5 g na kilogram tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne (nasyčovací fáze) a poté 1 g po dobu 8 týdnů (udržovací fáze). Svalová tkáň každého vzorku byla zmražená, lyofilizována a rozemletá v koloidním mlýnku. Vzniklý tkáňový prášek byl smíchán s bromidem draselným a po opětovném vysušení byla směs stlačena do KBr tablety. Byly analyzovány 4 skupiny potkanů – bez fyzického tréninku, s fyzickým tréninkem, s fyzickým tréninkem a suplementací a pouze se suplementací. Výsledná spektra byla srovnána se spektrem čistého kreatinu a docházelo k výškovým rozdílům u píků v oblasti otisku prstu, konkrétně v oblastech  $1396$  a  $1308\text{ cm}^{-1}$ . FT-IR metoda bývá používána v oblasti diagnostiky onemocnění,

nebo forenzní analýzy a tato studie naznačuje její možné využití ke stanovení kreatinu v kosterním svalstvu.

### 2.3.3 Kapalinová chromatografie

Častěji využívanou analytickou technikou než výše zmíněné techniky pro stanovení samotného kreatinu, je kapalinová chromatografie. Jedná se o separační metodu, která poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o analytu. V principu jde o rozdělení složek směsi analytu mezi dvě fáze, stacionární (nepohyblivou) a kapalnou mobilní fází (pohyblivou). Využití nachází v mnoha oborech, například průmyslu, zdravotnictví, nebo farmacii. [26]

Velmi častá technika pro stanovení kreatinu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) pracující s menším průměrem částic stacionární fáze a vyšším tlakem [31, 32]. HPLC bývá kombinována s několika způsoby detekce – UV-VIS [33], fotometrická detekce [34], elektrochemická detekce, anebo například hmotnostní spektrometrie. [26]

Autoři A. K. Dash a A. Sawhney (2003) vyvinuli metodu pro stanovení kreatinu i kreatininu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí (při 205 nm) bez přídavku iontového párového činidla, které se u několika analýz kreatinu v HPLC systémech používalo (dodecylsírán sodný). Autoři studovali dvě formy kreatinu, kreatin monohydrát a dikreatin citrát a využili dvě práškové formy a jednu tekutou. Jako mobilní fází zvolili roztok síranu amonného ve vodě (45 mM), jako vnitřní standard byl použitý 4-(2-aminoethyl)benzensulfonamid, průtok byl nastaven na  $750 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  a každá analýza trvala méně než 7 minut za použití reverzní kolony C18. Autoři studie zjistili, že volně prodávané formy kreatinu obsahují zhruba o 2 % kreatinu méně, než je uváděno a současně lze detekovat i velmi malé množství kreatininu. Dále sledovali kinetiku degradace kreatinu ve vodě při 25 °C a určili jeho rychlostní konstantu. Závěr studie poukazuje na fakt, že volně prodejné formy kreatinu v kapalně formě by měly být opatřeny datem expirace, které se dá vypočítat na základě rychlostní konstanty degradace pro každou formu kreatinu, jelikož obsahovaly velmi malé množství kreatinu. [35]

Další typ detekce, konkrétně pulsní elektrochemickou detekci, využili autoři Yoonsun Mo a kol. (2003) ve studii stanovení kreatinu ve vodném prostředí a krevní plazmě u potkanů. Separace kreatinu probíhala na polymerní sulfonované koloně

s polyhydroxylovanou glukózou (pH = 13) při teplotě 45 °C. Elektrochemický detektor byl propojen s amperometrickou celou, která byla opatřena pracovní zlatou elektrodou a referentní argentchloridovou elektrodou. Volba mobilní fáze se lišila v závislosti na matrici. Pro stanovení kreatinu ve vodném prostředí byla mobilní fáze tvořena vodou, acetonitrilem, 10 mM octanem sodným a 1 M hydroxidem sodným (2,5:2,5:90:5 v/v/v/v). U analýzy vzorků krevní plazmy byla mobilní fáze jednodušší, konkrétně byla použita směs 1 M hydroxidu sodného a vody (5:95 v/v). Tato studie potvrdila, že výhodou elektrochemická detekce je nízká citlivost pro nearomatické sloučeniny ve srovnání s UV/VIS detekcí. Limity detekce kreatinu pomocí elektrochemické detekce činí  $LOD = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , zato u fotometrické detekce jsou devítinásobně vyšší  $LOD = 90 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Další výhodou je, že lze tuto analýzu provést i s malým množstvím vzorku, nevýhodou je však nutné použití specifické kolony. [35]

Analýzy kreatinu a kreatininu nemusí být primárně zaměřeny na studium jejich stability a rozpustnosti. Autoři Ning Sun a kol. (2019) využili HPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií MS/MS pro studium kreatinu, kreatininu a fosfokreatinu v krevní plazmě u dětí s virovou myokarditidou. Dětská virová myokarditida je časté onemocnění kardiovaskulárního systému, je vážnou hrozbou pro život a zdraví dětí pro své složité klinické projevy, rychlý vývoj a nedostatek specifických diagnostických metod. Právě synteticky vyrobený fosfokreatin, který je běžně používán jako lék u srdečního selhání a infarktu myokardu, byl prostudován kvůli objasnění metabolismu fosfokreatinu v kombinaci s tímto onemocněním, aby byl objasněn vztah mezi dávkováním, bezpečností a účinností. Separace probíhala na reverzní koloně C18 za použití gradientové eluce (mobilní fáze A: roztok octanu amonného, pH = 10, upraveno amoniakem a B: methanol). Vzorky plazmy byly připraveny metodou srážení proteinů a nebyl zde pozorován žádný vliv matrice. Tato validované farmakokinetická studie představila rychlou a citlivou metodu, která sledává aplikaci fosfokreatinu u dětí jako možnou. [36]

Většina metod se shoduje v typu chromatografie na reverzní fázi díky polární povaze kreatinu. Z výše zmíněných postupů také vyplývá, že dochází k různým volbám mobilních fází, různým volbám analytických koncovek a že se analýzy provádí běžně jak v izokratické, tak gradientové eluci.

### 2.3.4 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie je další separační metodou, která se oproti kapalinové chromatografii liší ve skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. V porovnání s kapalinovou chromatografií je tato technika vhodná pro analýzu těkavých látek, kterou kreatin sám o sobě není. Proto musí být v každém postupu pro analýzu pomocí plynové chromatografie přítomen proces derivatizace, jak aminových skupin, tak ketoskupin. Trimethylsilylace a trifluoracetylace kreatinu a kreatininu jsou nejstarší publikované derivatizační metody pro analýzu GC-MS v lidském séru pomocí plamenové nebo elektronové ionizace. [37]

Jedním ze známých derivatizačních činidel je N, O-bistrifluoracetamid (BSTFA), které reaguje s mnoha funkčními skupinami (hydroxylovými, karboxylovými a aminovými skupinami) a je často využíváno pro analýzu aminokyselin. Autoři F. Nasrallah a kol. (2010) toto činidlo použili a aby došlo k separaci kreatinu ve vzorcích moči, upravili vzorky následujícím způsobem. Vzorek moči (100  $\mu$ l) byl smíchán s roztokem kyseliny 2-fenylbutanové (100  $\mu$ l), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu vápenatého (50  $\mu$ l), roztokem toluenu (600  $\mu$ l) a hexafluoracetylacetonu (50  $\mu$ l). Směs byla zahřívána po dobu 2 h na 80 °C, po vychladnutí došlo pomocí centrifugace k oddělení toluenové fáze, která se odebrala a vysušila pomocí proudu dusíku. Proces derivace byl zahájen přidáním 50  $\mu$ l BSTFA a 50  $\mu$ l chloroformu a zahříváním po dobu 30 minut při 65 °C. Po zchladnutí a přepipetování do vhodných eppendorfek byly vzorky připraveny na GC-MS analýzu. Tato validovaná metoda zajišťuje reprodukovatelné a rychlé měření kreatinu ve vzorcích moči. [38]

Nedávno byl autorským kolektivem O. Begou a kol. (2021) prokázán katalyzující efekt činidla BSTFA na rozklad kreatinu. Druhé derivatizační činidlo, které bylo ve studii vyzkoušeno, je anhydrid kyseliny pentafluoropropionové (PFPA) reagující se stejnými funkčními skupinami jako BSTFA. Všechny vzorky moči byly odfoukány dusíkem do sucha a proces byl zopakován po přidání ethanolu, aby došlo k odstranění zbytkové vody. Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l derivatizačního činidla a vzorky byly udržovány 60 min při 60 °C. Po zchladnutí a přepipetování do vhodných eppendorfek byly vzorky připraveny na měření, které probíhalo pomocí chemické ionizace jak v kladném, tak záporném módu. Výsledky prokázaly, že tyto činidla usnadňují přeměnu kreatinu na kreatinin a nejsou tedy vhodná pro specifickou analýzu. Na druhou stranu bylo



zjištěno, že vzniklé časně eluující N,N,O-tris(trimethylsilyl) deriváty jsou užitečné pro přesné měření součtu kreatininu a kreatinu v lidské moči. Tento postup se oproti výše zmíněné studii liší především úpravou vzorku před měřením a dobou derivatizace. [37]

I přes potíže s derivatizací, může být tato metoda přínosem pro usnadnění diagnostiky syndromu nedostatku kreatinu (CDS) zahrnující tři vrozené poruchy metabolismu. První je deficit enzymu L-Arginin:glycinamidinotransferázy (AGAT), druhou je deficit enzymu guanidinoacetát N-methyltransferázy (GAMT) a třetí je absence SLC6A8, kreatinového transportéru. Tato neurologická onemocnění jsou léčitelná a mohou být diagnostikovány právě analýzou kreatinu, guanidinoacetátu a kreatininu v tělesných tekutinách. Pokud dochází ke správné diagnóze v kojeneckém věku, léčba mívá pozitivní výsledky. Z tohoto důvodu je důležité investovat, či podporovat jak vývoj léčebných prostředků, tak výzkum rychlejších a nízko nákladových analytických metod. [38, 39]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Ke studii kreatinu/kreatininu bylo použito několik náhodně vybraných forem (Obrázek 16) volně prodejných kreatinových přípravků, různých firem. Konkrétně se jedná o formy kreatin monohydrátu (Extrifit), kreatin hydrochloridu (GymBeam), kreatin ethylesteru (Survival), tri-kreatin malátu (Muscle Mode) a kre-alkalynu (Amix).



Obrázek 16: Fotografie všech použitých forem kreatinu (převzato ze stránek výrobců)

#### 3.1 Chemikálie

V této práci bylo ke stanovení kreatinu/kreatininu použito kromě výše zmíněných kreatinových forem několik chemikálií:

- octan amonný (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- amoniak vodný roztok 25 % (Penta s.r.o., Katovice, Česká republika)
- methanol 100% (w/w), čistota gradient grade, (VWR Chemicals, Radnor, PA, USA)
- kyselina octová <99 %, (w/w) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- octan sodný (Penta s.r.o., Katovice, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 37% (w/w) (Merck, Hohenbrunn, Německo)
- citrulin (Extrifit, s.r.o., Dolní Újezd, Česká republika)
- kreatinin (Merck, Hohenbrunn, Německo)
- deionizovaná voda

## 3.2 Přístroje a pomůcky

Seznam přístrojového vybavení a laboratorních pomůcek:

- analytické váhy: Mettler Toledo XSE205 (Mettler Toledo, Columbus, USA)
- deionizační stanice Millipore Direct-Q UV (Millipore S.A.S, Molsheim, Francie)
- pH metr: inoLab 7110; pH elektroda: SenTix 41 (WTW, Weilheim in Oberbayern, Německo)
- centrifuga: Hettich Mikro 120 (Hettich Instruments, Beverly, MA, USA)
- automatické mikropipety,
- 21 ks 200ml skleněných lahvíček
- špičky
- eppendorfky (240 ks)
- stojan na vialky/eppendorfky
- parafilm M – netoxická fólie
- odměrný válec

### 3.2.1 Kapalinový chromatograf s UV a MS detekcí

Pro stanovení kreatinů byl použitý kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, Milford, USA). Systém byl vybaven UV/VIS detektorem s diodovým polem a hmotnostním spektrometrem Synapt G1 (Waters, USA). Vzorby byly dávkovány pomocí autosampleru v módu fulloop o objemu 10  $\mu\text{l}$  a ionizace byla zapříčiněna elektrosprejem (Z-sprej). V této práci byla použita kolona Ascentis Express C18 (10 x 2,1 mm,  $d_p = 2,7 \mu\text{m}$ , tloušťka porézní vrstvy 0,5  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich). Pro měření byly nastaveny tyto parametry: sprejovací napětí bylo 2,5 kV v pozitivním módu, napětí na sampling cone 45 V, teplota zdroje 120 °C, desolvatační teplota 40 °C, průtok desolvatačního plynu 600  $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$ , kterým byl dusík a kolizním plynem byl argon. U stanovení kreatinů bylo využito gradientu: 0-2 min: 98 % A, 2 % B; 4-5 min: 80 % A, 20 % B; 7-7,5 min: 0 % A, 100 % B; 8-10 min: 98 % A, 2 % B. Průtok byl nastaven na 0,2 ml/min a doba analýzy byla nastavena na 10 min. Analyty byly proměřeny v rozmezí 210-400 nm, spektra vyhodnocována při vlnové délce 230 nm (viditelný pík kreatinu i kreatininu).

## 3.3 Pracovní postup

### 3.3.1 Příprava roztoků

Měření stability pěti různých forem kreatinu bylo prováděno ve čtyřech různých prostředích – deionizované vodě, roztoku podobného svým pH prostředí džusu, roztoku kyseliny chlorovodíkové o stejné koncentraci jako je v žaludku a roztoku vody s citrulinem. Bylo připraveno vždy 1200 ml zásobního roztoku všech výše zmíněných prostředí kromě citrulinového roztoku, který byl připraven přímo do lahviček o objemu 200 ml až těsně před samotným přidáním jednotlivých forem kreatinu.

Nejprve byly připraveny dva zásobní roztoky. Zásobní roztok podobný svým pH prostředí džusu o celkovém objemu 1200 ml byl připraven smícháním 12 g octanu sodného a 12 ml kyseliny octové, aby vznikl 1% roztok octanového pufru. Takto připravený roztok má hodnotu  $\text{pH} = 4,5$ , proto byla přidávána kyselina až do výsledného  $\text{pH} = 3,5$ . Toto pH roztoku bylo zvoleno v závislosti na pH nejběžnějších ovocných džusů (Tabulka II).

Tabulka II: Přehled pH nejběžnějších ovocných džusů [40]

Typ ovocného džusu	pH
Jablečný	3,6
Pomerančový	3,8
Ananasový	3,4
Grepový	3,2
Mangový	3,7
Lesní plody	3,8
Brusinkový	2,6

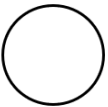
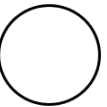
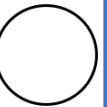
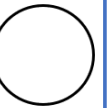
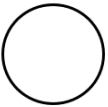
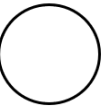
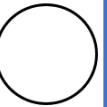
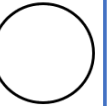
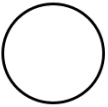
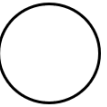
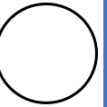
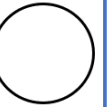
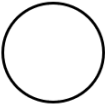
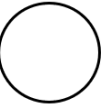
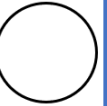
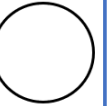
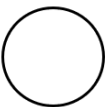
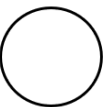
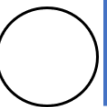
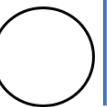
Dalším zásobním roztokem je roztok kyseliny chlorovodíkové o výsledné koncentraci  $0,16 \text{ mol.l}^{-1}$ , což je koncentrace kyseliny chlorovodíkové v žaludku. Tento zásobní roztok byl připraven přidáním 15,776 ml kyseliny chlorovodíkové (37%,  $12,17 \text{ mol.l}^{-1}$ ) do celkového objemu 1200 ml deionizované vody.

Roztoky citrulinu byly připraveny těsně před rozpuštěním kreatinu. Vždy bylo přidáno 5 g citrulinu do 200 ml deionizované vody, aby bylo dodrženo jeho doporučené

dávkování. Roztok citrulinu byl jako poslední prostředí zvolen z důvodu časté kombinace citrulinu s kreatinem v různých stimulačních předtréninkových přípravcích (např. SWAT od Best Nutrition, Serious Pre od Prom-In), kde má citrulin pomoci zvyšování plazmatické koncentrace kreatinu. Dalším důvodem vybrání citrulinu je jeho přeměna v ledvinách na aminokyselinu arginin, která je důležitým reaktantem pro vznik kreatinu.

### 3.3.2 Odběr a příprava na měření

Po přípravě dvou výše zmíněných zásobních roztoků bylo odváženo vždy 5 g od každého typu kreatinu a každá navážka byla nachystána ve čtyřech opakováních. Celkem bylo nachystáno dvacet vzorků všech forem kreatinu. Stejná navážka 5 g byla připravena i u citrulinu, která byla navážena dohromady šestkrát. Dále bylo nachystáno dvacet jedna 200 ml lahviček a do každé bylo odměrným válcem odměřeno 200 ml příslušného roztoku – do pěti lahviček byla odměřena deionizovaná voda, do dalších pěti roztok „džusu“, do dalších pěti lahviček bylo přidán roztok „žaludku“ a do posledních šesti lahviček bylo odměřeno 200 ml deionizované vody a přidáno vždy 5 g citrulinu. Následně byl odebrán z nerozlitého množství všech zásobních roztoků a nachystaného malého zásobního roztoku citrulinu vždy 1 ml a všechny vzorečky byly označeny jako blank a byly následně zamrazeny. Poté byly navážené vzorky kreatinu rozpuštěny tak, aby každá forma kreatinu byla rozpuštěna v jiném prostředí. Celé schéma přípravy roztoků kreatinů je zobrazeno na Obrázku 17.

	Voda	pH 3,5	Žaludek	Citrulin
<b>Kreatin monohydrát</b>				
<b>Krealkalyn</b>				
<b>Kreatin ethyl ester</b>				
<b>Kreatin hydrochlorid</b>				
<b>Tri-kreatin malát</b>				

Obrázek 17: Schéma přípravy roztoků kreatinů

Jak je patrné u obrázků 18 a 22, u kreatin monohydrátu a tri-kreatin malátu došlo k úplnému rozpuštění. Formy kre-alkalynu (Obrázek 19), ethyl esteru (Obrázek 20) a hydrochloridu (Obrázek 21) obsahovaly navíc oproti ostatním formám i protispěkové látky, které jsou nerozpustné a jsou patrné na hladinách u všech prostředích.



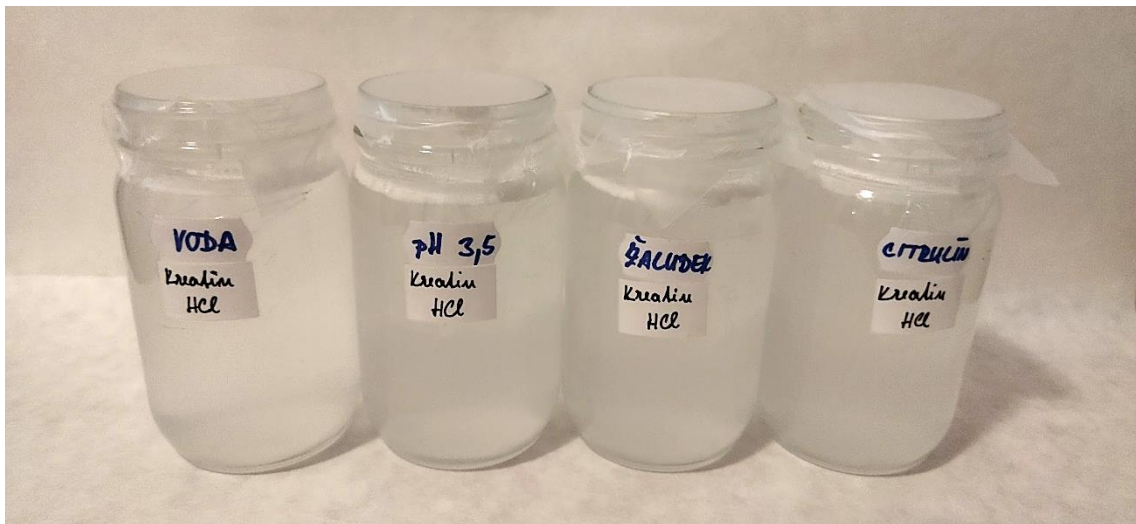
Obrázek 18: Rozpuštěný kreatin monohydrát ve všech prostředích



Obrázek 19: Rozpuštěný kre-alkalyn ve všech prostředích



Obrázek 20: Rozpuštěný kreatin ethyl ester ve všech prostředích



Obrázek 21: Rozpuštěný kreatin hydrochlorid ve všech prostředích



Obrázek 22: Rozpuštěný tri-kreatin malát ve všech prostředích

Po rozpuštění všech forem kreatinů byl okamžitě odebrán 1 ml z každého roztoku a následně zamražen a odběr byl označen časem 0 h. Ostatní odběry probíhaly v časech 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 h (7 dní) a po každém odběru byly okamžitě zamraženy. Po skončení odběru kreatinových vzorků byla připravena mobilní fáze, konkrétně byl použit roztok octanu amonného (mobilní fáze A). Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 77,08 mg octanu amonného v 500 ml deionizované vody a pomocí roztoku amoniaku byl roztok upraven na  $\text{pH} = 10$ . Dalším roztokem byl nachystán methanol HPLC kvality jako mobilní fáze B.

Dále byly rozmrazeny vzorky jedné formy kreatinu všech časových odběrů a blanky. Rozmražené vzorky kreatinu byly zcentrifugovány po dobu 1 min při 14000 rpm, aby došlo k odstranění pevných protispékavých látek. Z každého vzorku kreatinu bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  a mobilní fází, tedy roztokem octanu amonného, byl vzorek doplněn na výsledný objem 1 ml, aby byla výsledná koncentrace kreatinu 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Takto připravené vzorky byly nachystány na analýzu pomocí HPLC-DAD a měření probíhalo ve třech opakováních. Tento postup ředění byl zopakován i u čistého roztoku citrulinu, který byl označen jako blank. Po proměření první formy kreatinu byl celý tento postup zopakován pro další zbylé čtyři kreatinové formy, opět ve třech opakováních. Během přípravy vzorků na analýzu bylo změřeno i  $\text{pH}$  roztoků.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Před samotným změřením stability jednotlivých forem kreatinu stability bylo provedeno měření, jak rozpuštění výše zmíněných pěti forem kreatinu ovlivní pH roztoků, jelikož pH dokáže ovlivnit samotnou stabilitu kreatinu. Prvním roztokem byla proměřena deionizovaná voda, aby bylo zjištěno pH samotných použitých forem kreatinu. Proměření roztoku citrulinu v tomto případě nebylo nutné, jelikož jeho pH v roztoku je neutrální. Byly však proměřeny oba kyselé roztoky, „žaludku“ i „džusu“, zda dojde k patrné změně pH po přidání pěti forem kreatinu.

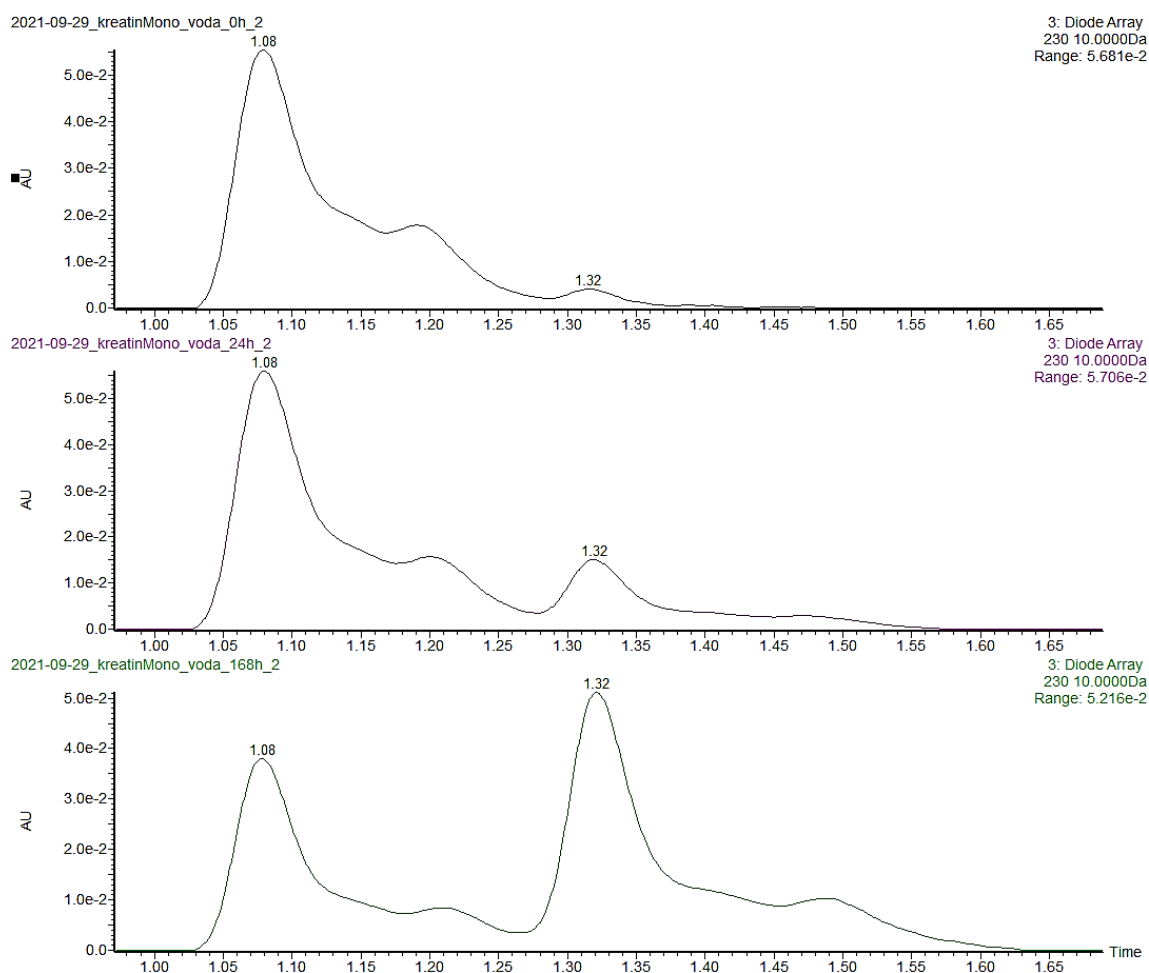
Tabulka III: Hodnoty pH použitých roztoků, forem kreatinů a jejich rozdíl pH

Forma kreatinu	Před přidáním		Po přidání		Rozdíl
Kreatin monohydrát	Voda	5.7	Voda	6.2	0.5
	pH "džusu"	3.5	pH "džusu"	3.1	-0.4
	pH "žaludku"	1.1	pH "žaludku"	2.0	0.9
Kreatin HCl	Voda	5.7	Voda	1.8	-3.9
	pH "džusu"	3.5	pH "džusu"	2.5	-1.0
	pH "žaludku"	1.1	pH "žaludku"	1.1	0.0
Kreatin EE	Voda	5.7	Voda	3.9	-1.8
	pH "džusu"	3.5	pH "džusu"	2.8	-0.7
	pH "žaludku"	1.1	pH "žaludku"	1.1	0.0
Kre-alkalyn	Voda	5.7	Voda	10.2	4,5
	pH "džusu"	3.5	pH "džusu"	3.2	-0.3
	pH "žaludku"	1.1	pH "žaludku"	2.0	0.9
Tri-kreatin malát	Voda	5.7	Voda	3.4	-2.3
	pH "džusu"	3.5	pH "džusu"	3.0	-0.5
	pH "žaludku"	1.1	pH "žaludku"	1.7	0.6

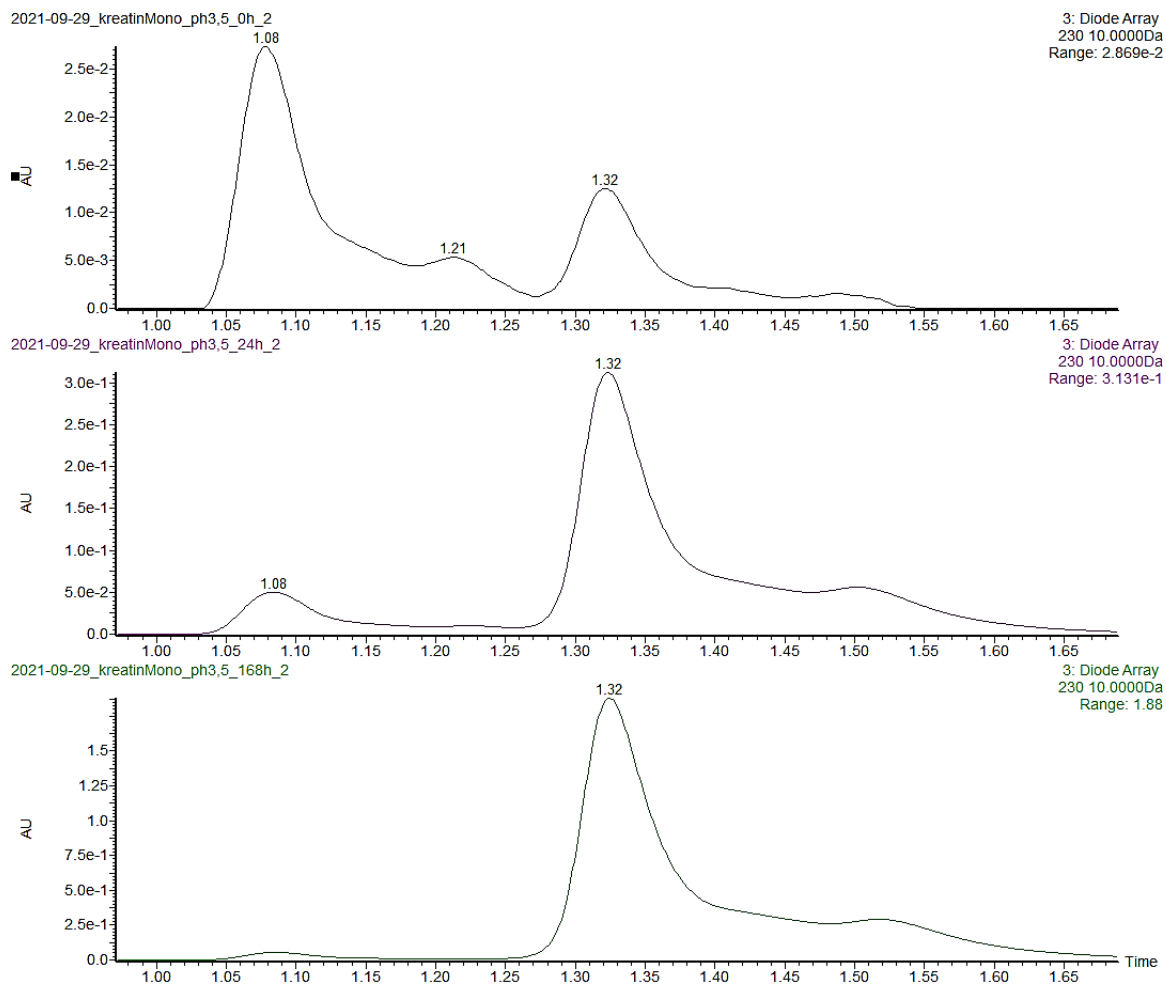
Tabulka III poskytuje několik zajímavých informací, které vycházejí z rozdílů pH roztoků před přidáním jednotlivých forem kreatinů a po jejich rozpuštění. Nejpoužívanější forma, kreatin monohydrát neovlivňuje pH všech třech proměřených prostředí. Další alkalická forma kre-alkalyn zvýšil pH u prostředí vody na hodnotu 10,2, naopak v kyselém prostředí nedošlo k výraznému zvýšení pH, dokonce v prostředí pH „džusu“ došlo k poklesu pouze o 0,3 na hodnotu pH = 3,2. Nejkyselejší formou je kreatin hydrochlorid, jehož hodnota pH ve vodě činila 1,8. Kreatiny ethyl ester a hydrochlorid jsou další kyselejší formou, které snížily pH vody, i „džusu“ a zároveň nesnížili hodnotu

pH „žaludku“. Posledním typem kreatinu je tri-kreatin malát, jehož rozpuštění snižuje pH vody na hodnotu pH = 3,4.

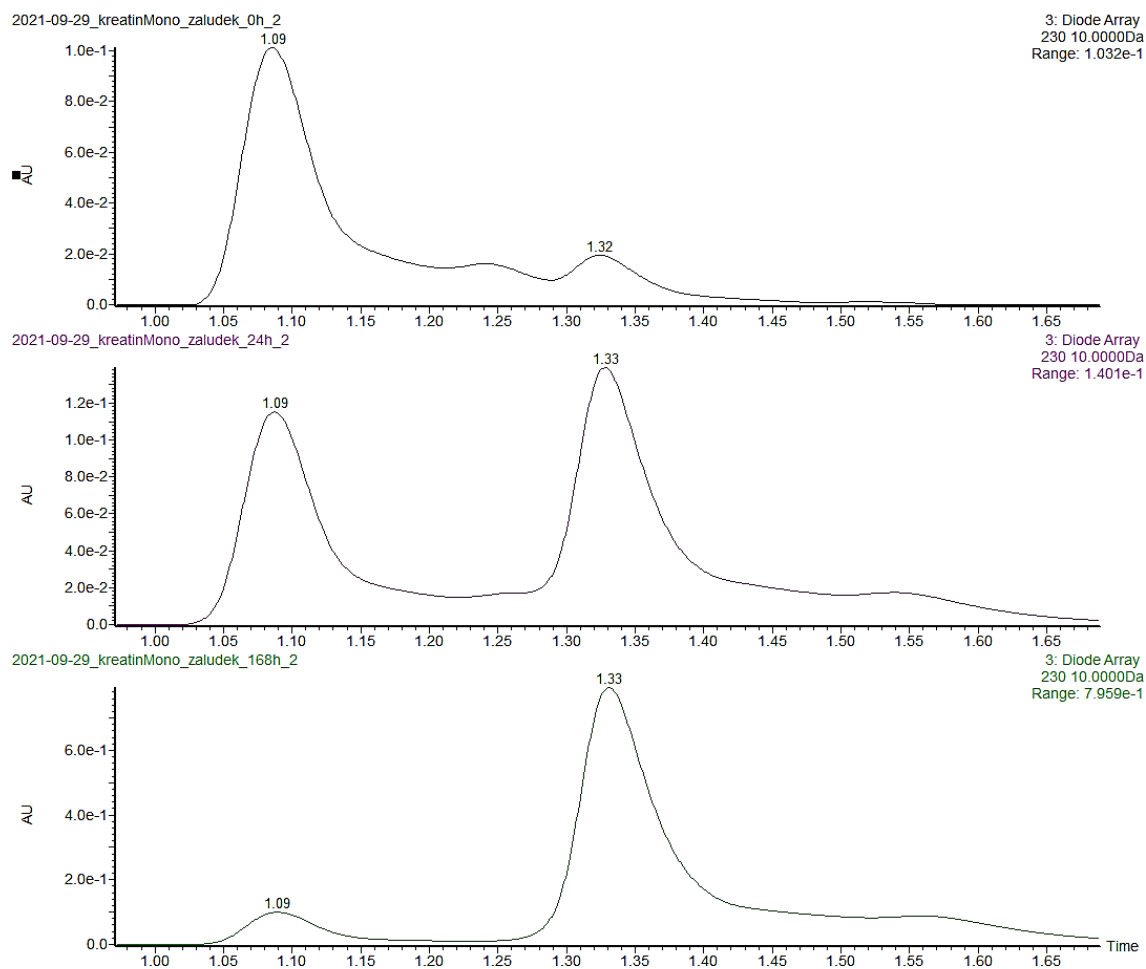
Po proměření pH následovalo změření několika forem kreatinů pomocí HPLC-DAD analýzy. Každá forma kreatinu byla změřena ve třech opakováních, kdy opakování měření proběhlo vždy po změření celé časové série jedné kreatinové formy. Poté byly z chromatogramů pomocí manuální integrace píků zaznamenány plochy píků kreatinu a kreatininu, které eluovaly v časech zhruba 1,08 min (kreatin) a 1,32 min (kreatinin). Jako příklad chromatografické separace jsou níže zobrazeny chromatogramy nejčastěji používané formy, kreatin monohydrátu, v časech 0 h, 24 h a 168 h ve všech čtyřech prostředích – vodě (Obrázek 23), roztoku pH „džusu“ (Obrázek 24), roztoku pH „žaludku“ (Obrázek 25) a roztoku citrulinu (Obrázek 26).



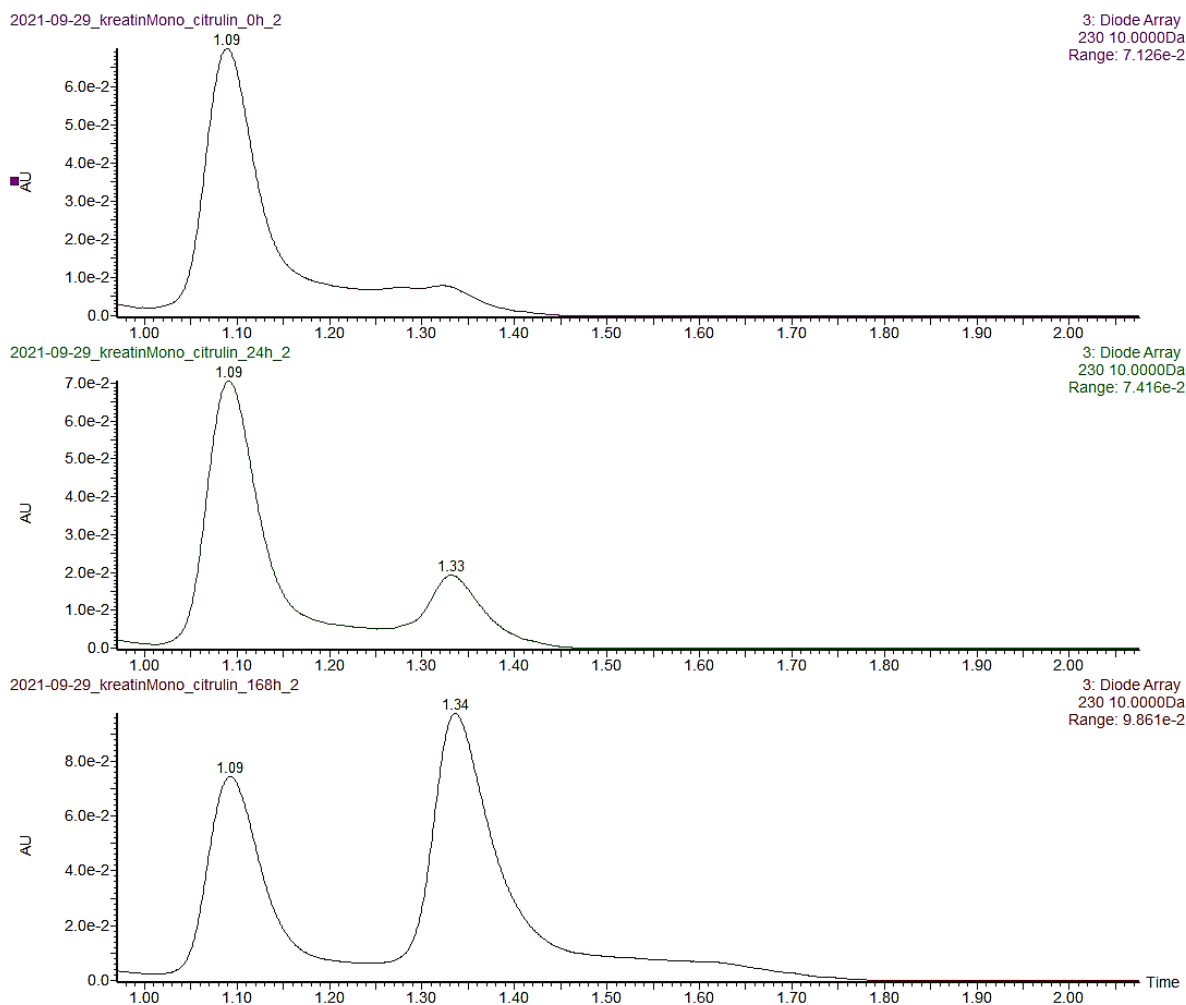
Obrázek 23: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v deionizované vodě v čase odběru 0, 24 a 168 h



Obrázek 24: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku pH „džusu“ v čase odběru 0, 24 a 168 h



Obrázek 25: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku pH „žaludku“ v čase odběru 0, 24 a 168 h

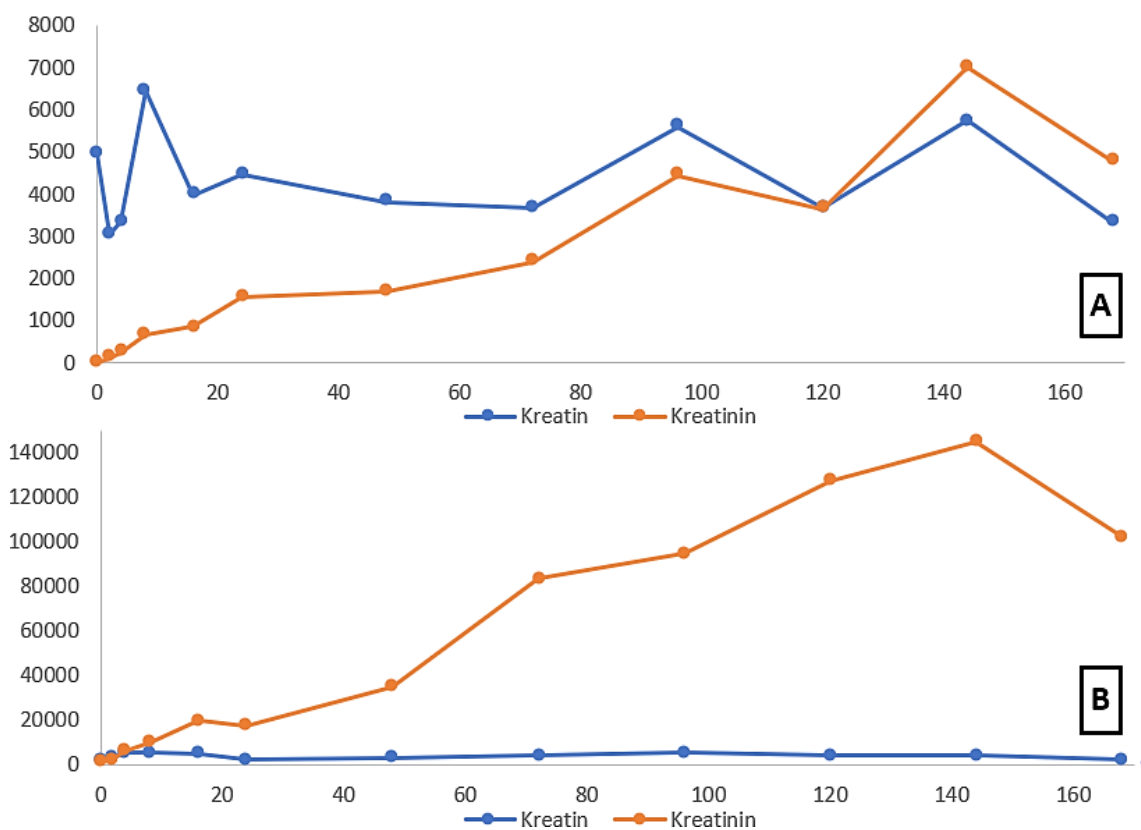


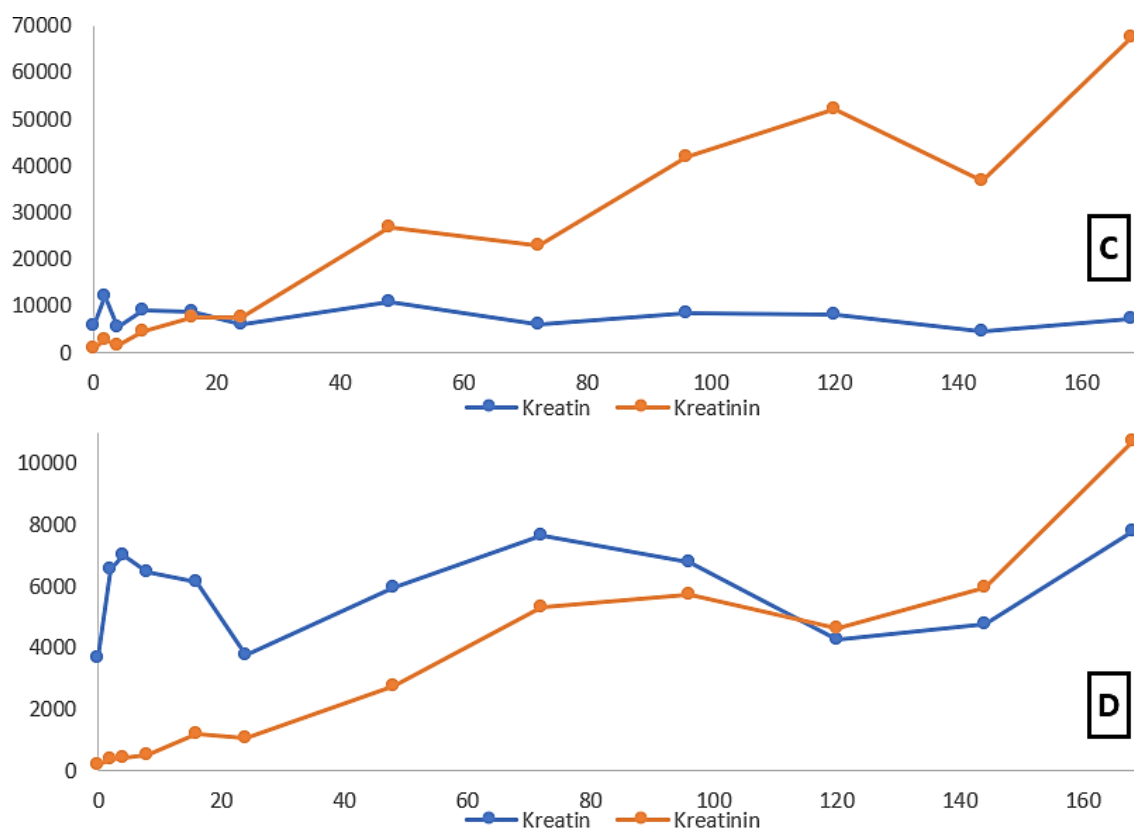
Obrázek 26: Chromatogramy kreatin monohydrátu rozpuštěného v roztoku citrulinu v čase odběru 0, 24 a 168 h

Plochy separovaných píků kreatinu a kreatininu ve všech třech opakováních byly zaznamenány do tabulek (viz Přílohy I, III a V) včetně vypočítaného průměru a směrodatných odchylek. Výsledky byly graficky zpracovány dvojím způsobem. V prvním grafickém zpracování byly použity zprůměrované hodnoty ploch píků kreatinu a kreatininu (viz Přílohy II, IV a VI) a v grafech závislosti na čase byly znázorněny i směrodatné odchylky. Jelikož analýza jedné formy kreatinu v jediném prostředí trvala 2 hodiny a až po změření celé série bylo spuštěno měření v opakování, došlo k časovému posunu prvního měření s druhým o dvě hodiny a prvního měření se třetím o čtyři hodiny. Tento časový posun zapříčinil změny degradace kreatinu na kreatinin a směrodatné odchylky jsou v tomto důsledku vyšší. Z tohoto důvodu jsou veškeré grafické závislosti zprůměrovaných hodnot obsaženy v *Přílohách* této práce. Aby byla degradace kreatinu co nejpřesněji popsána z hlediska přesnosti časových označení, byly v grafickém

znázornění použity plochy píků kreatinu a kreatininu pouze z prvního měření, které se nejvíce blíží hodnotám časového odběru. Plochy píků z prvního měření jednotlivých forem kreatinů byly vyneseny do grafu v závislosti na časových odběrech 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 h. Jako důležitý mezník pro porovnání degradace jednotlivých forem kreatinů a prostředí je doba, při které množství kreatininu přesáhne množství kreatinu a jedná se o bod, kde dochází k prolnutí křivek kreatinu a kreatininu v grafech.

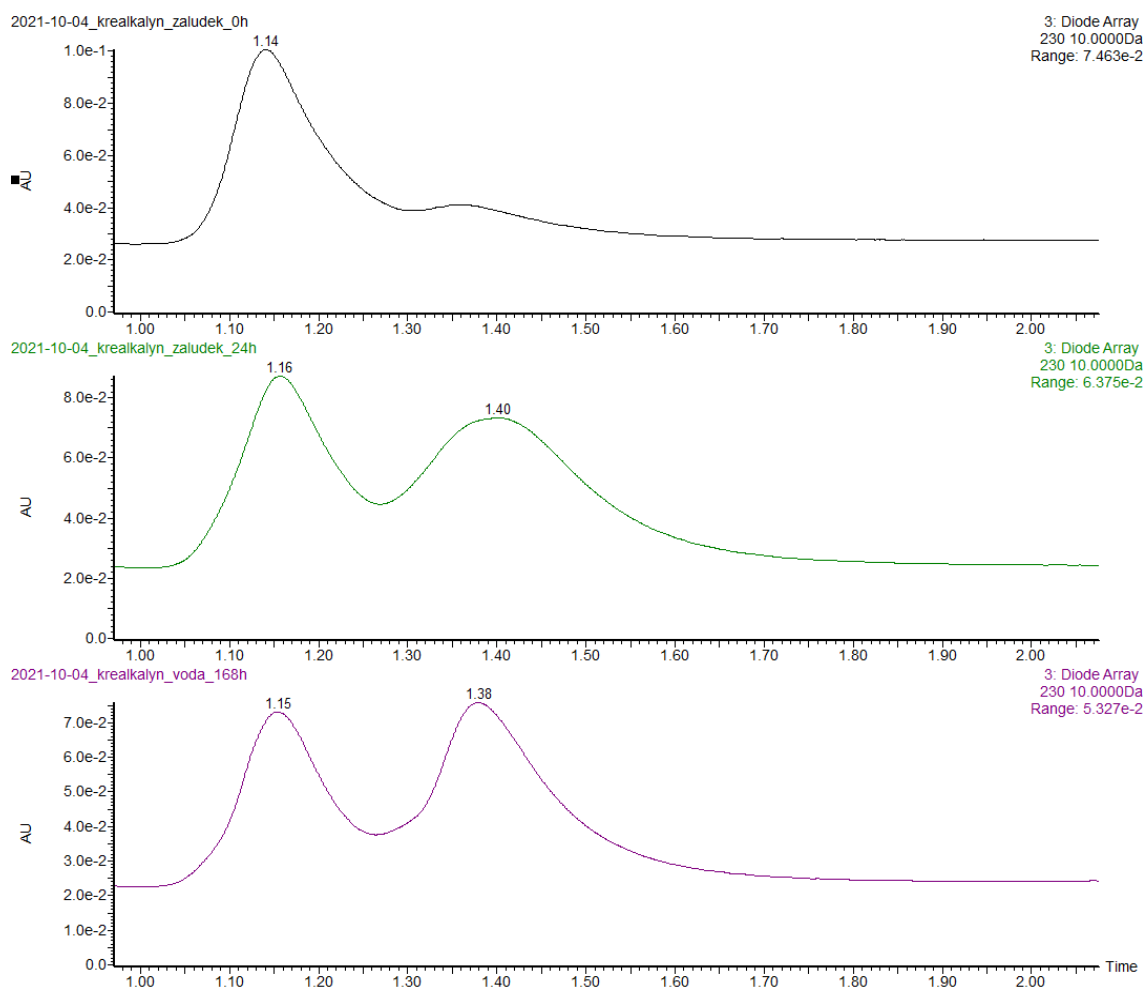
Na obrázku 27 jsou zobrazeny grafy závislosti plochy píků na čase u formy kreatin monohydrátu v prostředí deionizované vody (Obrázek 27 A), roztoku „džusu“ (Obrázek 27 B), roztoku „žaludku“ (Obrázek 27 C) a roztoku citrulinu (Obrázek 27 D). Ze všech grafů je patrné, že dochází k pomalé degradaci kreatinu kontinuálně, ovšem v některých prostředích probíhá degradace rychleji. Nejpomalejší degradace kreatin monohydrátu probíhá ve dvou prostředích. Prvním prostředím je voda, ve kterém dochází k přesáhnutí množství kreatininu nad kreatinem v čase 120 h, tj. za 5 dní. Téměř srovnatelný výsledek poskytuje prostředí roztoku citrulinu, ve kterém dochází k degradaci v čase 115 h. Naopak u roztoku „žaludku“ přesahuje množství kreatininu nad kreatinem už v čase 20 h. Nejrychlejší degradace kreatin monohydrátu však probíhá v prostředí pH „džusu“, ve kterém dochází k převýšení množství kreatininu už ve čtvrté hodině od rozpuštění.





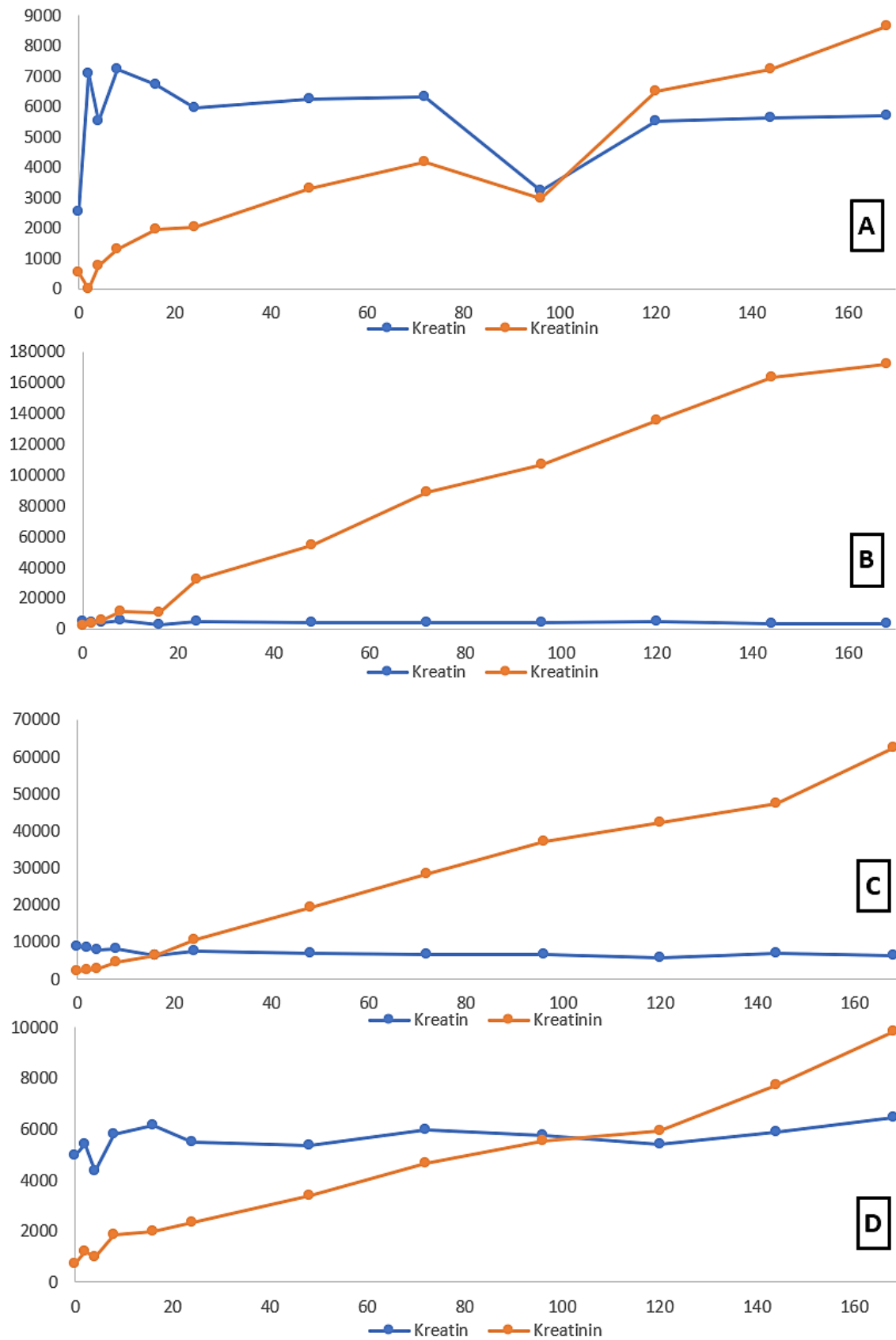
Obrázek 27: Závislost plochy píků na čase formy kreatin monohydrátu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu

Další analyzovanou formou je alkalický kre-alkalyn, jehož příklad separace je zobrazen na obrázku 28. Dále jsou na obrázku 29 zobrazeny grafy závislosti plochy píků na čase u formy kre-alkalynu v prostředí deionizované vody (Obrázek 29 A), roztoku „džusu“ (Obrázek 29 B), roztoku „žaludku“ (Obrázek 29 C) a roztoku citrulinu (Obrázek 29 D). U této formy kre-alkalynu probíhala nejpomalejší degradace v prostředí vody a roztoku citrulinu, stejně jako u formy kreatin monohydrátu. V prostředí vody i citrulinu dochází k přesáhnutí množství kreatininu nad kreatinem v časech 100 a 103 h. V porovnání s kreatin monohydrátem probíhala degradace o 20 hodin rychleji v případě vody a 12 h v případě citrulinu, což je v praktickém využívání kreatinů zanedbatelný rozdíl. Naopak nejrychlejší degradace kre-alkalynu probíhá v prostředí pH „džusu“, ve kterém dochází k převýšení množství kreatininu už v čase 4 h, což je stejná časová degradace jako u kreatin monohydrátu. Posledním prostředím je roztok „žaludku“, kde množství kreatininu přesáhlo množství kreatinu za 16 h od rozpuštění.



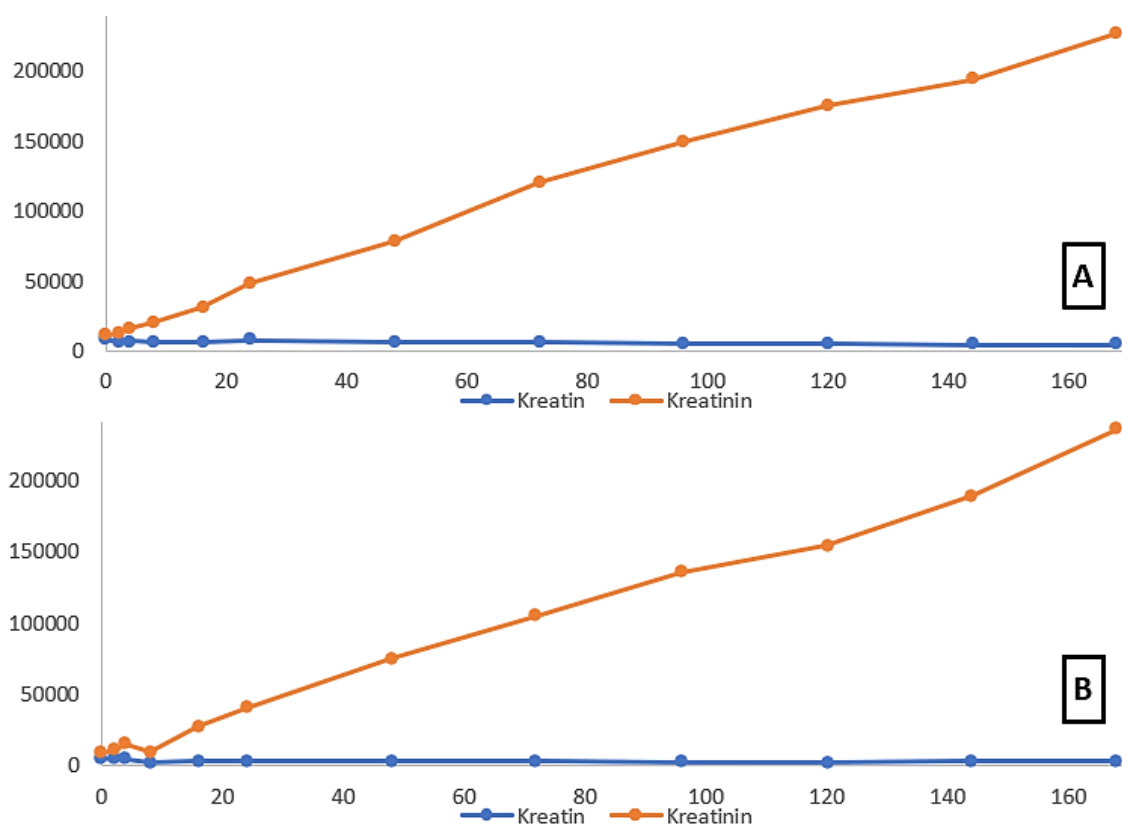
Obrázek 28: Chromatogramy kre-alkalynu rozpuštěného ve vodě v čase odběru 0, 24 a 168 h

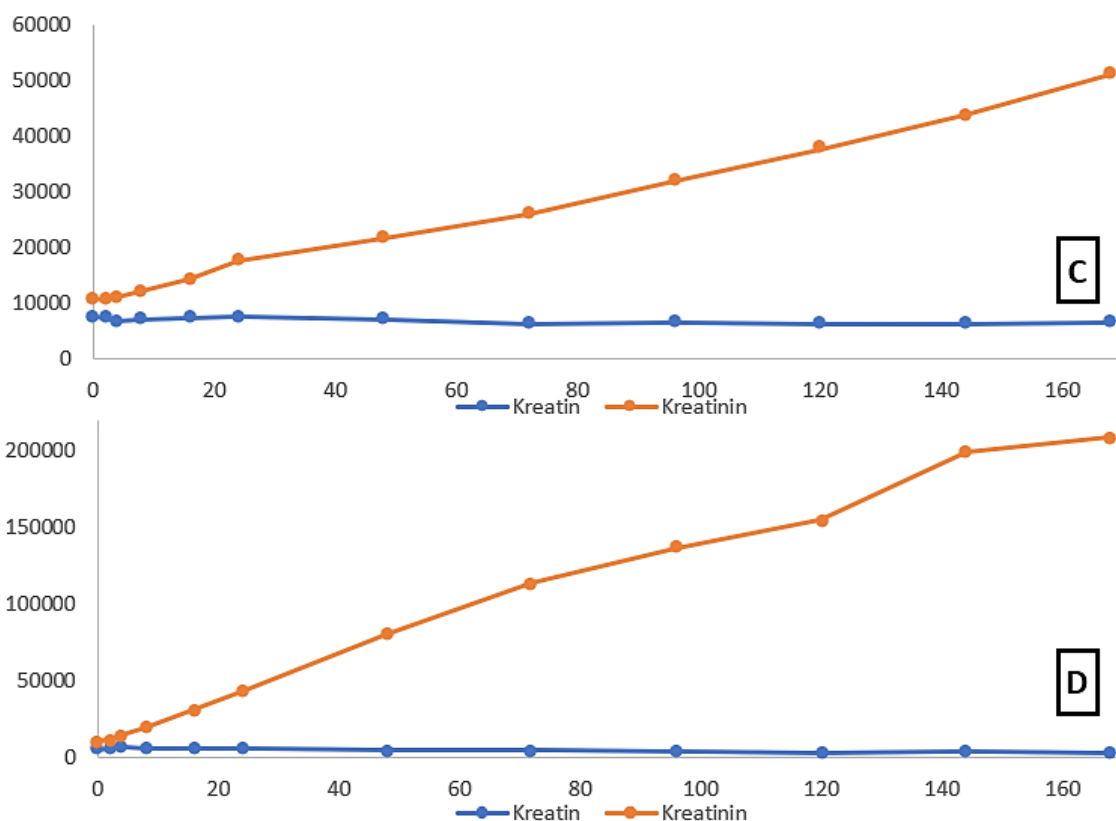




Obrázek 29: Závislost plochy píků na čase formy kre-alkalynu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu

Třetím stanovovaným typem kreatinu je tri-kreatin malát, jehož grafická závislost je zobrazena na obrázku 30. Ze všech prostředí, vody (Obrázek 30 A), roztoku pH „džusu“ (Obrázek 30 B), roztoku „žaludku“ (Obrázek 30 C) a roztoku citrulinu (Obrázek 30 D) je patrná velmi rychlá degradace, oproti výše zmíněným formám, kreatin monohydrátu a kre-alkalynu. Tato degradace je dle grafů natolik rychlá, že ani není patrné prolnutí křivek kreatinu a kreatininu. Při proměření pH této formy rozpuštěné ve vodě (Tabulka II) došlo ke snížení pH na hodnotu 3,4. Tato hodnota pH = 3,4 ve vodném roztoku je téměř totožná s pH roztoku „džusu“, u kterého byla degradace kreatinu obecně nejrychlejší (u formy monohydrátu a kre-alkalynu). Tato podobnost je nejpravděpodobnějším důvodem, proč u formy tri-kreatin malátu probíhá nejrychlejší degradace, kterou potvrzuje i studie Howarda a Harrise (1997), kde autoři publikují nejrychlejší degradaci kreatinu při pH = 3,5.





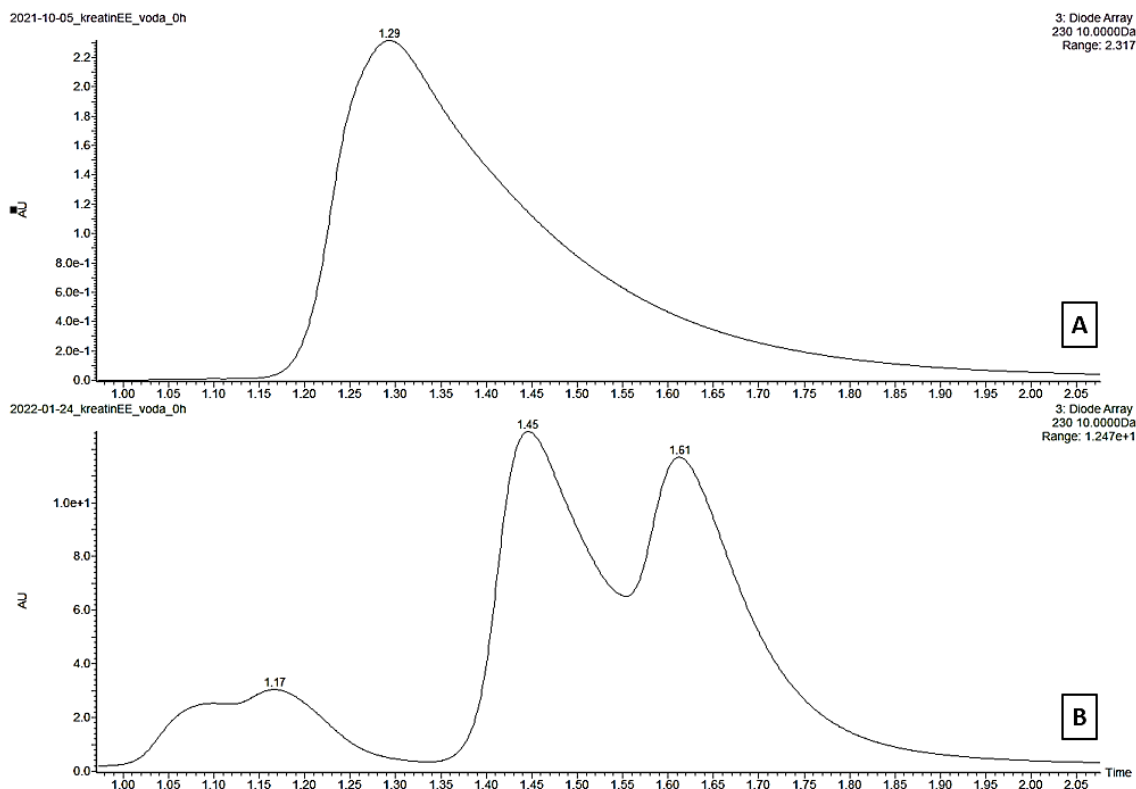
Obrázek 30: Závislost plochy píků na čase formy tri-kreatin malátu v různých prostředích – A: voda, B: roztok pH „džusu“, C: roztok pH „žaludku“ a D: roztok citrulinu

U výše tří zmíněných forem kreatinu došlo k separaci látek kreatinu a kreatininu. Časy, ve kterých množství kreatininu převyšuje nad kreatinem, tedy časy degradace, jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulce IV.

Tabulka IV: Stabilita forem kreatin monohydrátu, kre-alkalynu a tri-kreatin malátu ve čtyřech prostředích

Forma kreatinu	Prostředí	Degradace kreatinu (h)
Kreatin monohydrát	Voda	120
	pH "džusu"	4
	pH "žaludku"	20
	citrulin	115
Kre-alkalyn	Voda	100
	pH "džusu"	4
	pH "žaludku"	16
	citrulin	103
Tri-kreatin malát	Voda	0
	pH "džusu"	0
	pH "žaludku"	0
	citrulin	0

Posledními analyzovanými roztoky jsou formy kreatin ethyl esteru a hydrochloridu. Bohužel u těchto dvou forem buď nedošlo k separaci, nebo byla degradace kreatinu příliš rychlá, jelikož byl v chromatogramech přítomný pouze jeden pík. Jako ilustrační příklad je znázorněn chromatogram kreatin ethyl esteru rozpuštěný ve vodném prostředí (Obrázek 31 A). Po čtyřměsíční časové prodlevě byly vzorky těchto dvou forem změřeny znovu v časech odběru 0, 24 a 168 h ve všech prostředích, za účelem identifikace látky v  $RT = 1,30$  min. Zmražené vzorky byly znovu rozmrazeny, zcentrifugovány a zředěny znovu stejným postupem, jak už bylo popsáno v podkapitole *Odběr a příprava na měření* a následně byly proměřeny. Po druhém proměření ale došlo k separaci těchto látek (Obrázek 31 B). Rozdílné retenční časy u prvního a druhého měření jsou z důvodu jiné délky propojovacích kapilár u kapalinového chromatografu. Následně byly zaznamenány plochy píků. Po vynesení do grafů však byly přítomné pouze rostoucí křivky kreatinu a kreatininu, značící příliš velkou degradaci vzorků. Z tohoto důvodu nejsou tyto výsledky součástí této práce.



Obrázek 31: Chromatogram kreatin ethyl esteru rozpuštěného ve vodě, odběr v čase 0; A: sériové měření všech kreatinů B: dodatečné změření stejného vzorku s časovým odstupem

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prozkoumat stabilitu pěti forem kreatinu pomocí HPLC-DAD analýzy ve čtyřech různých prostředích – deionizované vodě, roztoku podobného svým pH prostředí džusu, roztoku kyseliny chlorovodíkové o stejné koncentraci jako je v žaludku a roztoku vody s citrulinem. Po rozpuštění forem kreatinů v těchto prostředích byl odběr prováděn kontinuálně sedm dní. Po změření a vyhodnocení byly zjištěny následující fakta týkající se použitých forem kreatinů:

- Kreatin monohydrát je nejstabilnější formou v porovnání s ostatními formami.
- K separaci došlo u forem kreatin monohydrátu, kre-alkalynu a tri-kreatin malátu.
- Forma tri-kreatin malátu byla nejméně stabilní, zřejmě v důsledku změny hodnoty pH (pH = 3,4) změřené po jeho rozpuštění.
- Po zopakování měření původně neseparovaných forem kreatin ethyl esteru a hydrochloridu došlo k separaci v důsledku dodatečného změření stejného vzorku s časovým odstupem. Současně nejspíše došlo k úplné degradaci kreatinu, proto nebylo možné tyto dvě formy dále studovat.

Současně bylo v této práci zjištěno několik důležitých informací v souvislosti s použitými prostředími, ve kterých byly rozpuštěny formy kreatinu:

- Prostředí vody a roztoku citrulinu jsou nejvhodnější v důsledku pomalé degradace kreatinu ve vzorcích monohydrátu a kre-alkalynu
- Nejrychlejší degradace probíhá při použití roztoku pH „džusu“ (pH = 3,5).
- V nejkyseljším pH prostředí (pH „žaludku“) nedochází k nejrychlejší degradaci, neboť při velmi nízkém pH dochází k protonaci amidové skupiny kreatinu, která brání intramolekulární cyklizaci kreatinu na kreatinin. [8]

Z těchto informací vyplývá, že doporučení ve sportovní komunitě míchání kreatinu do ovocných džusů není nejlepší volbou a má za následek mnohem rychlejší proces degradace kreatinu, než je tomu u vody, nebo u směsí kreatinu s citrulinem.

## 5.1 Summary

This work aimed to analyze the stability of five forms of creatine by HPLC-DAD analysis in four different media – deionized water, a solution with pH similar to a juice, a HCl solution of the same concentration as in the stomach, and water with citrulline. After dissolving the forms of creatine in respective media, sampling was performed continuously for seven days. After measurement and evaluation, the following facts concerning the forms of creatine used were found:

- Creatine monohydrate was the most stable form compared to other forms.
- Separation occurred in the forms of creatine monohydrate, cre-alkalyn, and tri-creatine malate.
- The tri-creatine malate form was the least stable, probably due to the change in pH (pH = 3,4) measured after its dissolution.
- After repeating the measurement of the originally unseparated forms of creatine ethyl ester and hydrochloride, separation occurred due to the additional measurement of the same sample in intervals. Simultaneously, complete degradation of creatine was found, so it was not possible to further study these two forms.

Additionally, several important pieces of information were found in connection with the used media, where the creatine forms were dissolved:

- Water and citrulline solutions are the most suitable due to the slow degradation of creatine in monohydrate and cre-alkalyn samples.
- The fastest degradation occurs when using a pH „juice“ solution (pH = 3,5).
- There is no fastest degradation in the most acidic pH environment (pH of the stomach) because at very low pH a protonation of an amidic group of creatine occurs, which prevents intramolecular cyclization of creatine to creatinine.

This information shows that the recommendation in the sports community to mix creatine into fruit juices is not the best choice and results in a much faster process of creatine degradation than in water or mixtures of creatine with citrulline.

## 6 LITERATURA

- [1] J. R. Stout, J. Antonio, and D. Kalman, *Essentials of creatine in sports and health*. New Jersey: Humana Press, 2008. doi: 10.1007/978-1-59745-573-2.
- [2] M. B. Vranes and S. Papovic, “New Forms of Creatine in Human Nutrition,” in *Human Health and Nutrition*, S. M. Ostojic, Ed. Nova Science Publishers, Inc. Chapter, 2015.
- [3] R. Cooper, F. Naclerio, J. Allgrove, and A. Jimenez, “Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: An update,” *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 9, no. 1, p. 11, 2012, doi: 10.1186/1550-2783-9-33.
- [4] M. Negro, I. Avanzato, and G. D’Antona, “Creatine in skeletal muscle physiology,” in *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Elsevier, 2019, pp. 59–68. doi: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00008-4.
- [5] L. Roubík, “Kreatin,” in *Moderní výživa ve fitness a silových sportech*, s. r. o. Erasport, Ed. Praha, 2018, pp. 334–341.
- [6] P. Grasgruber and J. Cacek, *SPORTOVNÍ GENY*, 1st ed. Brno: Computer Press, a.s., 2008.
- [7] R. B. Kreider *et al.*, “International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine,” *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 14, no. 1, p. 18, Jun. 2017, doi: 10.1186/s12970-017-0173-z.
- [8] A. N. Howard and R. C. Harris, “COMPOSITIONS CONTAINING CREATINE,” 5968544, 1999
- [9] R. Jäger, M. Purpura, A. Shao, T. Inoue, and R. B. Kreider, “Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine,” *Amino Acids*, vol. 40, no. 5, pp. 1369–1383, May 2011, doi: 10.1007/s00726-011-0874-6.
- [10] M. Wyss and R. Kaddurah-Daouk, “Creatine and Creatinine Metabolism,” *Physiol. Rev.*, vol. 80, pp. 1108–1182, 2000.
- [11] “Síla skrytá v kreatinu: Nejnovější poznatky o nejpoužívanějším kulturistickém suplementu, určeném k budování síly a hmoty,” *Svět kulturistiky*, pp. 32–36, Dec.

2016.

- [12] D. G. Candow, P. D. Chilibeck, and S. C. Forbes, “Creatine supplementation and aging musculoskeletal health,” *Endocrine*, vol. 45, no. 3, pp. 354–361, 2014, doi: 10.1007/s12020-013-0070-4.
- [13] E. B. Gonzales, R. N. Smith, and A. S. Agharkar, “A review of creatine supplementation in age-related diseases: More than a supplement for athletes,” *F1000Research*, vol. 3, p. 11, Sep. 2014, doi: 10.12688/f1000research.5218.1.
- [14] H. Dickinson, S. Ellery, Z. Ireland, D. LaRosa, R. Snow, and D. W. Walker, “Creatine supplementation during pregnancy: Summary of experimental studies suggesting a treatment to improve fetal and neonatal morbidity and reduce mortality in high-risk human pregnancy,” *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 14, no. 1, Apr. 2014, doi: 10.1186/1471-2393-14-150.
- [15] R. Jäger, M. Purpura, A. Shao, T. Inoue, and R. B. Kreider, “Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine.,” *Amino acids*, vol. 40, no. 5, pp. 1369–1383, May 2011. doi: 10.1007/s00726-011-0874-6.
- [16] A. R. Jagim *et al.*, “A buffered form of creatine does not promote greater changes in muscle creatine content, body composition, or training adaptations than creatine monohydrate,” *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 9, p. 18, Sep. 2012, doi: 10.1186/1550-2783-9-43.
- [17] M. Spillane *et al.*, “The effects of creatine ethyl ester supplementation combined with heavy resistance training on body composition, muscle performance, and serum and muscle creatine levels,” *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 6, p. 14, Feb. 2009, doi: 10.1186/1550-2783-6-6.
- [18] M. Tayebi and H. Arazi, “Is creatine hydrochloride better than creatine monohydrate for the improvement of physical performance and hormonal changes in young trained men?,” *Sci. Sport.*, vol. 35, no. 5, pp. 135–141, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.scispo.2019.07.013.
- [19] E. Galvan *et al.*, “Acute and chronic safety and efficacy of dose dependent creatine nitrate supplementation and exercise performance,” *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 13, no. 1, Mar. 2016, doi: 10.1186/s12970-016-0124-0.



- [20] S. Sterkowicz, A. K. Tyka, M. Chwastowski, K. Sterkowicz-Przybycień, A. Tyka, and A. Klys, "The effects of training and creatine malate supplementation during preparation period on physical capacity and special fitness in judo contestants," *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 9, p. 8, Sep. 2012, doi: 10.1186/1550-2783-9-41.
- [21] R. Jäger *et al.*, "The effects of creatine pyruvate and creatine citrate on performance during high intensity exercise," *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 5, 2008, doi: 10.1186/1550-2783-5-4.
- [22] R. Jäger, R. C. Harris, M. Purpura, and M. Francaux, "Comparison of new forms of creatine in raising plasma creatine levels," *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 4, p. 5, 2007, doi: 10.1186/1550-2783-4.
- [23] M. Kodíček, O. Valentová, and R. Hynek, *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická (VŠCHT), 2015.
- [24] L. Owen and S. I. Sunram-Lea, "Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine," *Nutrients*, vol. 3, no. 8, pp. 735–755, 2011, doi: 10.3390/nu3080735.
- [25] I. Pischel and T. Gastner, "CREATINE-ITS CHEMICAL SYNTHESIS, CHEMISTRY, AND LEGAL STATUS," in *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*, G. S. Salomons and M. Wyss, Eds. Springer, 2007, pp. 291–307.
- [26] M. Křížek and J. Šíma, *Analytická chemie*. České Budějovice, 2015.
- [27] J. R. Delanghe and M. M. Speeckaert, "Creatinine determination according to Jaffe - What does it stand for?," *NDT Plus*, vol. 4, no. 2, pp. 83–86, 2011, doi: 10.1093/ndtplus/sfq211.
- [28] A. Krishnegowda, N. Padmarajaiah, S. Anantharaman, and K. Honnur, "Spectrophotometric assay of creatinine in human serum sample," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, pp. 2018–2024, May 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.07.030.
- [29] M. T. Alula, L. Karamchand, N. R. Hendricks, and J. M. Blackburn, "Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine," *Anal. Chim. Acta*, vol.

1007, pp. 40–49, May 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.12.016.

- [30] S. Mohammadi and G. Khayatian, “Highly selective and sensitive photometric creatinine assay using silver nanoparticles,” *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 7–8, pp. 1379–1386, Feb. 2015, doi: 10.1007/s00604-015-1460-5.
- [31] S. Ganguly, S. Jayappa, and A. K. Dash, “Evaluation of the Stability of Creatine in Solution Prepared From Effervescent Creatine Formulations,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, no. 2, p. 25, 2003, [Online]. Available: <http://www.pharmscitech.org>
- [32] H. Kim *et al.*, “Simultaneous urinary creatine and creatinine analysis by high performance liquid chromatography,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 37, no. 5, pp. 756–758, May 2016, doi: 10.1002/bkcs.10743.
- [33] M. Tranberg, M. H. Stridh, B. Jilderos, S. G. Weber, and M. Sandberg, “Reversed-phase HPLC with UV detection for the determination of N-acetylaspartate and creatine,” *Anal Biochem*, vol. 343, no. 1, pp. 179–182, 2005.
- [34] A. E. Mansilla, I. Durdn Merds, and F. Salinas, “Analysis of Pteridines and Creatinine in Urine by HPLC with Serial Fluorimetric and Photometric Detectors,” *Chromatographia*, vol. 53, pp. 510–514, 2001.
- [35] Y. Mo, D. Dobberpuhl, and A. K. Dash, “A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 32, no. 1, pp. 125–132, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0731-7085(03)00028-1.
- [36] N. Sun, Q. Li, L. Zhao, H. He, M. Zhang, and X. Wang, “Simultaneous quantitative analysis of phosphocreatine, creatine and creatinine in plasma of children by HPLC–MS/MS method: Application to a pharmacokinetic study in children with viral myocarditis,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 33, no. 8, p. 11, Aug. 2019, doi: 10.1002/bmc.4558.
- [37] O. Begou, K. Weber, B. Beckmann, and D. Tsikas, “Gc-ms studies on derivatization of creatinine and creatine by BSTFA and their measurement in human urine,” *Molecules*, vol. 26, no. 11, 2021, doi: 10.3390/molecules26113206.
- [38] F. Nasrallah, M. Feki, G. Briand, and N. Kaabachi, “GC/MS determination of guanidinoacetate and creatine in urine: A routine method for creatine deficiency

syndrome diagnosis,” *Clin. Biochem.*, vol. 43, no. 16–17, pp. 1356–1361, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.004.

- [39] A. Schulze, “Creatine deficiency syndromes,” in *Handbook of Clinical Neurology*, 1st ed., vol. 113, no. October, O. Dulac, M. Lassonde, and H. B. Sarnat, Eds. Elsevier B.V., 2013, pp. 1837–1843. doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00053-8.
- [40] A. Reddy, D. F. Norris, S. S. Momeni, B. Waldo, and J. D. Ruby, “The pH of beverages in the United States,” *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 147, no. 4, pp. 255–263, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.adaj.2015.10.019.

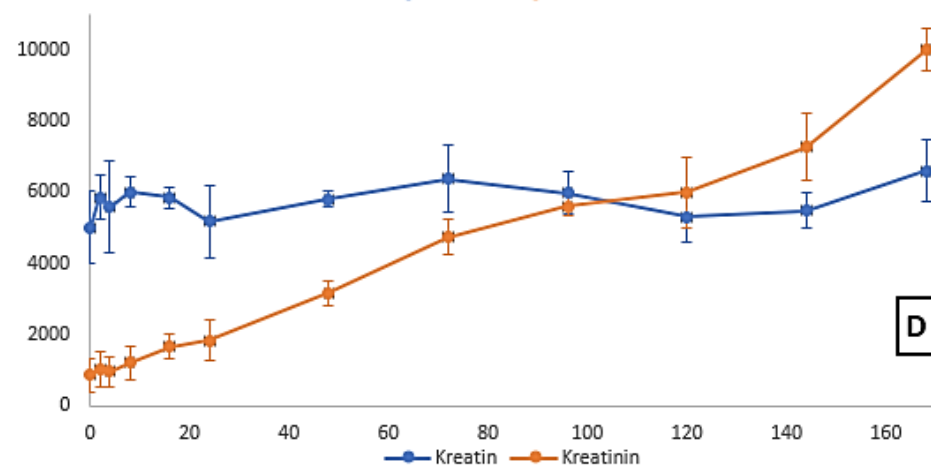
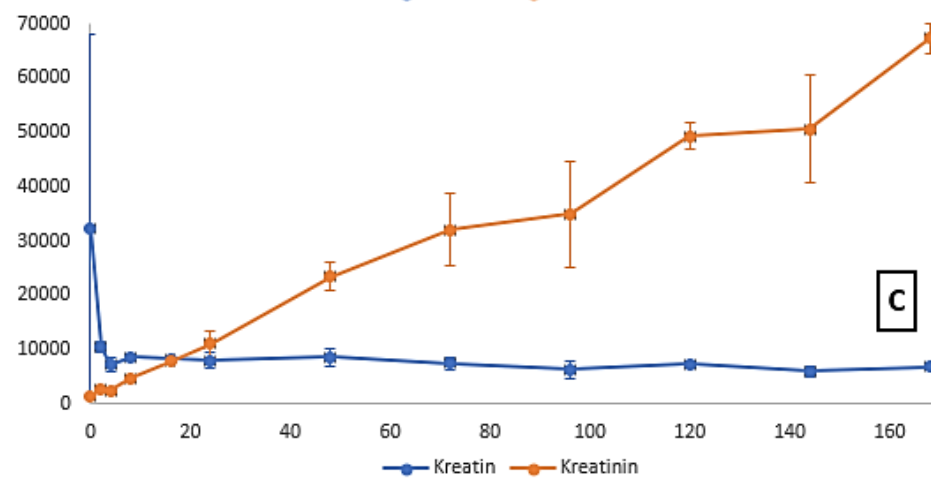
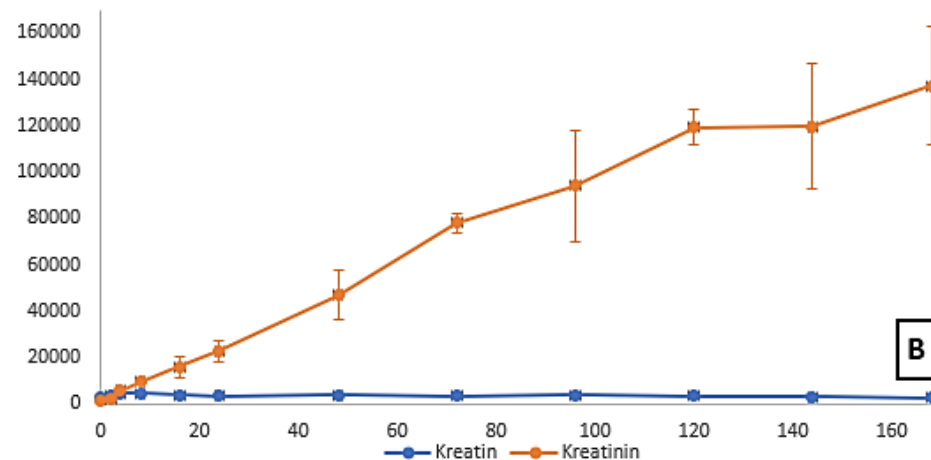
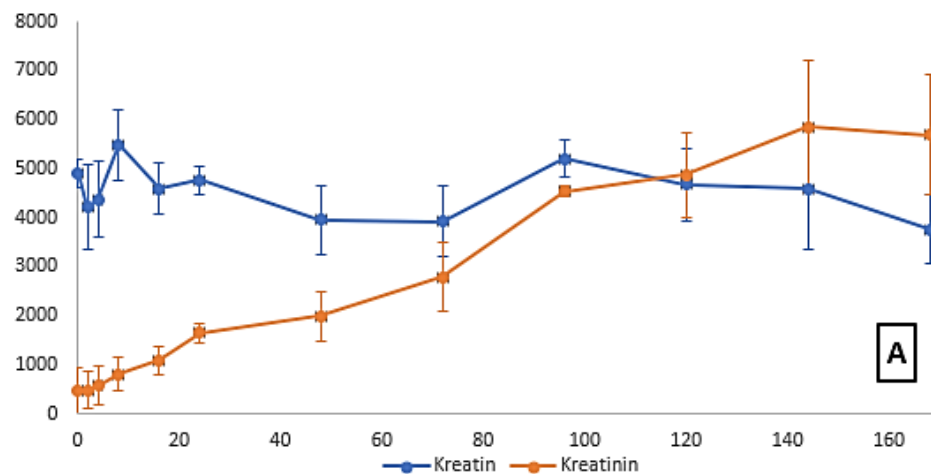
# PŘÍLOHY

Příloha I: Tabulka ploch píků kreatinu a kreatininu formy kreatin monohydrátu ve čtyřech prostředích, včetně průměru a směrodatné odchylky

Typ kreatinu	Čas odběru (h)	Kreatin, plocha píku					Kreatinin, plocha píku				
		1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$	1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$
Kreatin monohydrát - voda	0	4973.30	5238.16	4535.55	4915.67	289.72	0.00	273.70	1141.19	471.63	486.46
	2	3039.92	5118.63	4458.49	4205.68	867.25	104.19	347.96	1008.30	486.82	381.94
	4	3345.82	5261.76	4535.06	4380.88	789.74	241.74	344.84	1142.05	576.21	402.32
	8	6441.85	5294.40	4723.73	5486.66	714.48	674.75	487.63	1263.47	808.61	330.58
	16	3983.50	5262.63	4539.79	4595.30	523.67	855.57	937.67	1480.73	1091.32	277.38
	24	4463.97	5137.45	4690.39	4763.94	279.82	1553.20	1461.08	1940.21	1651.50	207.59
	48	3819.55	3177.50	4891.18	3962.74	706.89	1701.58	1567.90	2697.17	1988.88	503.80
	72	3681.53	3183.91	4924.09	3929.84	731.80	2397.99	2191.92	3791.06	2793.65	710.27
	96	5602.28	5317.19	4716.74	5212.07	369.08	4450.60	4492.79	4674.64	4539.34	97.21
	120	3676.01	5468.74	4890.73	4678.49	747.11	3658.85	5447.58	5537.34	4881.26	865.15
	144	5743.41	5158.79	2863.76	4588.65	1242.81	7007.85	6582.97	3962.60	5851.14	1346.62
168	3321.37	3208.55	4751.29	3760.40	702.17	4779.71	4855.29	7429.68	5688.23	1231.78	
Kreatin monohydrát - pH "džusu"	0	2599.70	2321.54	3873.94	2931.73	675.86	1359.89	1013.97	2102.95	1492.27	454.32
	2	3158.91	2856.51	4279.11	3431.51	611.93	2224.40	1971.89	3287.88	2494.72	570.24
	4	5672.63	4547.77	4222.32	4814.24	621.35	6434.06	5329.07	5269.62	5677.58	535.46
	8	5362.47	4777.65	4416.56	4852.23	389.75	10187.37	9561.82	9161.48	9636.89	422.16
	16	5265.09	4582.85	2455.11	4101.01	1196.70	19846.65	18758.52	9758.82	16121.33	4520.85
	24	2678.99	4051.97	3612.88	3447.94	572.52	17512.74	28863.57	22498.17	22958.16	4645.36
	48	3260.76	4686.74	4286.40	4077.97	600.52	34799.29	61362.41	45123.71	47095.14	10933.58
	72	4420.66	2700.97	3920.44	3680.69	722.24	83551.81	78046.68	72574.91	78057.80	4481.31

	96	5745.88	3445.50	2555.57	3915.65	1344.20	94866.34	122818.08	64561.56	94082.00	23789.59
	120	4229.18	2575.70	3800.93	3535.27	700.68	127361.01	121526.81	109523.70	119470.51	7425.80
	144	4149.11	1597.06	3776.69	3174.28	1125.58	144744.20	82687.97	132137.14	119856.44	26781.28
	168	2301.69	2594.29	3775.60	2890.53	637.14	102433.79	160554.09	149175.73	137387.87	25148.99
Kreatin monohydrát - pH "žaludku"	0	5889.33	8559.12	82667.31	32371.92	35580.91	1132.07	1408.88	2119.78	1553.57	416.01
	2	12096.60	10045.02	9699.67	10613.76	1057.96	2714.99	1825.20	3296.46	2612.21	605.02
	4	5378.11	8222.47	8021.40	7207.33	1296.06	1700.99	2253.23	3454.46	2469.56	732.01
	8	9144.32	8408.92	8360.13	8637.79	358.72	4525.40	4570.05	5032.55	4709.34	229.27
	16	8881.61	8138.28	8160.32	8393.41	345.33	7645.37	7827.67	7964.10	7812.38	130.57
	24	6112.48	8776.37	9310.12	8066.32	1398.66	7643.27	12884.39	12617.05	11048.24	2410.15
	48	11040.40	7236.76	7775.04	8684.07	1680.61	26834.62	22862.50	20550.00	23415.71	2595.33
	72	5986.77	7981.21	8694.24	7554.07	1145.84	22890.77	38318.73	35074.64	32094.72	6641.56
	96	8417.78	6545.75	4363.43	6442.32	1656.79	41897.01	41929.35	21021.67	34949.34	9848.36
	120	8364.98	6525.54	7085.27	7325.26	769.88	52192.81	49377.15	46378.45	49316.13	2374.10
	144	4726.04	6386.45	7192.87	6101.79	1027.00	36886.99	59994.89	54967.96	50616.61	9922.85
	168	7326.25	6469.09	6818.99	6871.44	351.89	67631.38	70697.74	63741.20	67356.77	2846.63
Kreatin monohydrát - citrulin	0	3655.61	5289.18	6088.63	5011.14	1012.54	201.73	1230.37	1145.98	859.36	466.29
	2	6542.48	5067.29	5949.91	5853.23	606.11	357.73	1305.91	1488.63	1050.76	495.69
	4	6999.26	5852.01	3884.40	5578.56	1286.25	413.28	1454.31	1000.49	956.03	426.16
	8	6465.68	5459.43	6081.48	6002.20	414.61	523.39	1574.75	1519.86	1206.00	483.20
	16	6156.47	5447.72	5920.84	5841.68	294.71	1180.26	1895.31	1913.71	1663.09	341.50
	24	3763.40	5718.06	6074.99	5185.48	1016.07	1050.70	2072.76	2388.93	1837.46	571.10
	48	5986.05	5500.11	5921.36	5802.50	215.45	2762.50	3075.12	3649.46	3162.36	367.32
	72	7651.57	5476.59	6008.92	6379.03	925.70	5319.57	4102.36	4761.02	4727.65	497.49
	96	6780.75	5359.90	5809.67	5983.44	592.93	5732.22	5219.09	5849.92	5600.41	273.88
	120	4280.07	5837.92	5807.65	5308.55	727.35	4624.59	6430.81	6951.50	6002.30	997.11
	144	4782.95	5908.10	5722.83	5471.29	492.58	5973.98	7630.37	8175.22	7259.85	936.06
	168	7812.77	6109.22	5858.43	6593.47	868.23	10712.28	10009.82	9255.71	9992.61	594.77

Příloha II: Závislost zprůměrovaných ploch píků na čase formy kreatin monohydrátu s chybovými úsečkami v různých prostředích – **A:** voda, **B:** roztok pH „džusu“, **C:** roztok pH „žaludku“ a **D:** roztok citrulinu



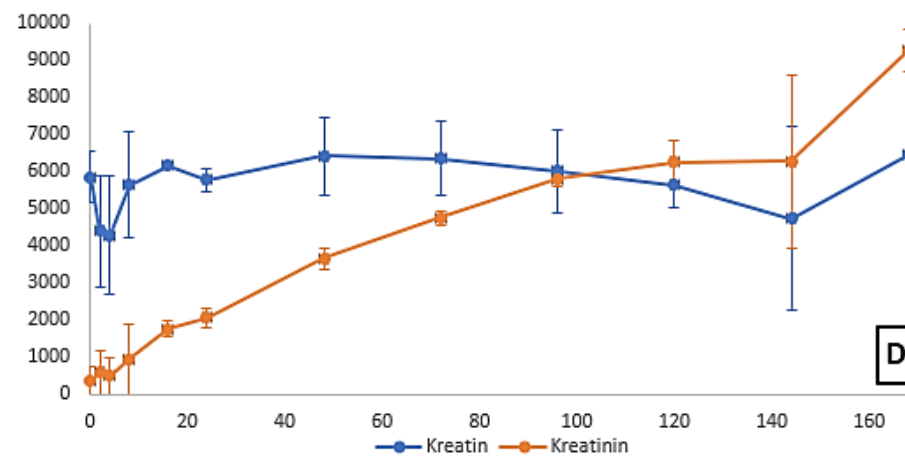
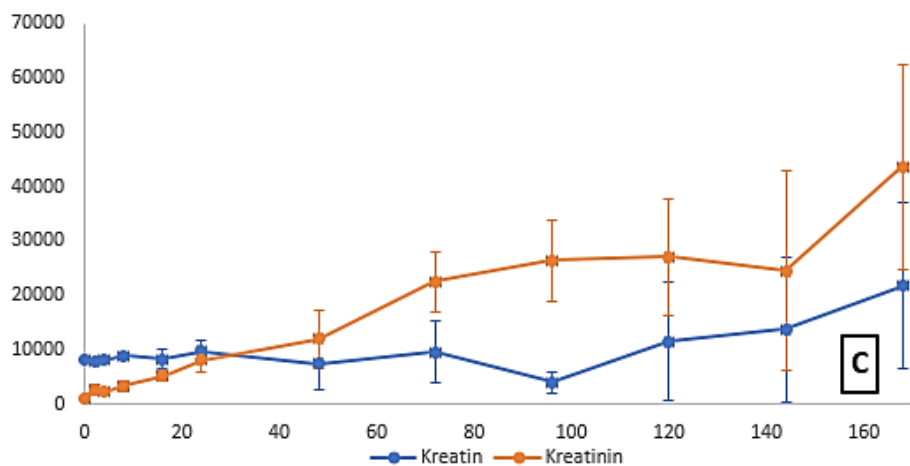
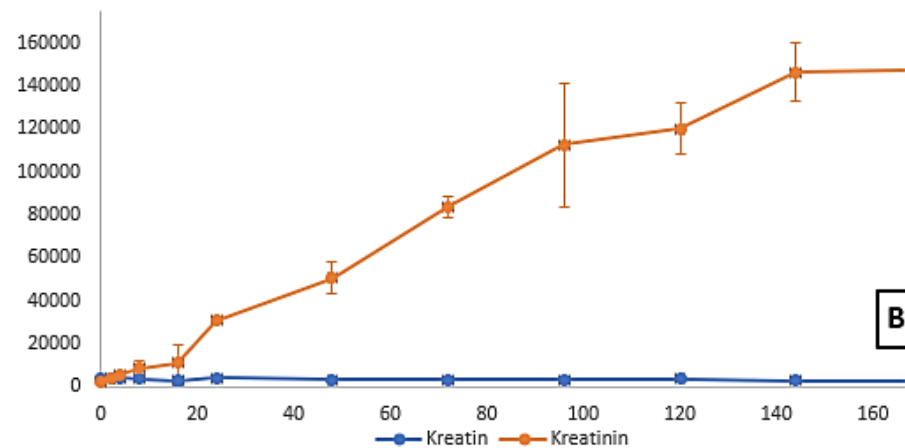
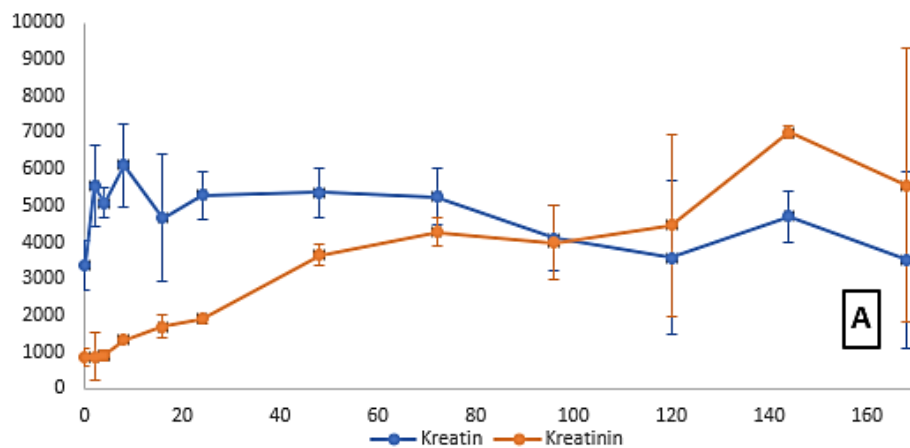
Příloha III: Tabulka ploch píků kreatinu a kreatininu formy kre-alkalynu ve čtyřech prostředích, včetně průměru a směrodatné odchylky

Typ kreatinu	Čas odběru (h)	Kreatin, plocha píku					Kreatinin, plocha píku				
		1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$	1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$
Krealkalyn - voda	0	2528.59	4116.87	3483.97	3376.48	652.85	535.46	1115.45	926.34	859.08	241.51
	2	7101.61	4548.98	4954.10	5534.89	1120.11	0.00	1217.26	1444.50	887.25	634.20
	4	5510.29	4665.84	0.00	5088.06	422.22	767.80	1062.21	0.00	915.00	147.20
	8	7224.80	4980.58	0.00	6102.69	1122.11	1306.00	1385.59	0.00	1345.80	39.79
	16	6722.86	4820.52	2467.73	4670.37	1740.39	1940.89	1923.58	1256.06	1706.84	318.83
	24	5954.56	4632.95	0.00	5293.75	660.80	2032.08	1787.21	0.00	1909.64	122.43
	48	6235.07	5309.65	4568.36	5371.02	681.81	3305.90	3625.00	4029.94	3653.61	296.28
	72	6325.65	4913.63	4508.20	5249.16	778.98	4182.83	3889.68	4784.85	4285.79	372.63
	96	3220.58	5007.70	0.00	4114.14	893.56	2981.05	5005.44	0.00	3993.24	1012.19
	120	5515.25	4568.38	664.21	3582.62	2099.52	6491.73	5953.67	957.45	4467.62	2491.76
	144	5624.66	4545.22	3952.55	4707.47	692.21	7244.57	6823.67	6960.60	7009.61	175.29
168	5701.63	4729.95	162.51	3531.36	2414.94	8638.27	7747.08	315.23	5566.86	3731.24	
Krealkalyn - pH "džusu"	0	4902.12	3938.73	3314.17	4051.67	653.18	2266.61	2441.62	2248.67	2318.97	87.04
	2	4172.25	3765.08	0.00	3968.67	203.59	3383.57	4003.01	0.00	3693.29	309.72
	4	4627.20	3501.49	0.00	4064.34	562.86	5656.66	5580.51	0.00	5618.58	38.07
	8	5502.91	3932.83	1744.67	3726.80	1541.19	11124.04	10218.73	4137.20	8493.32	3102.34
	16	2893.25	4635.48	147.19	2558.64	1847.55	11068.64	21365.15	500.92	10978.24	8518.03
	24	4778.21	3280.24	0.00	4029.22	748.98	32347.66	29221.24	0.00	30784.45	1563.21
	48	4491.79	2769.54	2134.45	3131.93	995.91	54789.25	56742.59	40592.49	50708.11	7197.14
	72	4611.94	1489.67	0.00	3050.81	1561.13	89006.67	78718.28	0.00	83862.48	5144.20
	96	4156.81	0.00	2163.04	3159.93	996.88	107091.77	149775.91	80623.39	112497.03	28488.95
	120	4666.12	3399.74	2016.58	3360.81	1082.02	135623.05	119439.98	105711.34	120258.13	12225.10
	144	3888.81	1536.21	2389.00	2604.67	972.48	163420.58	146108.41	129746.21	146425.07	13749.33
168	3513.74	0.00	1931.78	2722.76	790.98	172173.56	153911.55	116207.95	147431.02	23302.87	

Krealkalyn - pH "žaludku"	0	8732.78	8071.19	0.00	8401.98	330.79	2234.79	0.00	0.00	1117.40	1117.40
	2	8506.65	8385.82	7025.58	7972.68	671.52	2415.32	1745.84	3939.83	2700.33	918.09
	4	7865.29	8355.94	0.00	8110.61	245.33	2741.81	1989.17	0.00	2365.49	376.32
	8	8207.37	9615.90	0.00	8911.64	704.27	4491.86	2314.52	0.00	3403.19	1088.67
	16	6511.46	10200.21	0.00	8355.84	1844.38	6359.59	4223.41	0.00	5291.50	1068.09
	24	7701.91	11950.42	0.00	9826.16	2124.26	10492.07	5921.95	0.00	8207.01	2285.06
	48	7049.81	13434.07	1884.21	7456.03	4723.95	19370.26	10175.30	6621.18	12055.58	5371.93
	72	6773.08	17547.13	4582.18	9634.13	5666.37	28371.15	15261.94	24061.53	22564.87	5455.44
	96	6593.86	2292.35	3217.44	4034.55	1848.69	36997.06	20541.48	21932.54	26490.36	7451.03
	120	5757.52	26938.15	2200.13	11631.94	10920.13	42400.88	19362.84	19434.78	27066.16	10843.32
	144	6900.77	32543.84	2104.49	13849.70	13362.99	47299.33	23927.65	2387.68	24538.22	18340.19
	168	6538.54	37082.81	0.00	21810.68	15272.14	62361.07	24913.99	0.00	43637.53	18723.54
Krealkalyn - citrulin	0	4979.52	6671.07	5924.66	5858.41	692.16	718.47	0.00	0.00	359.24	359.24
	2	5395.95	5509.97	2286.25	4397.39	1493.53	1185.66	0.00	0.00	592.83	592.83
	4	4350.78	6212.75	2300.84	4288.12	1597.64	961.56	0.00	0.00	480.78	480.78
	8	5787.70	7322.66	3813.56	5641.31	1436.32	1873.51	0.00	0.00	936.76	936.76
	16	6140.25	6193.81	0.00	6167.03	26.78	1974.65	1551.22	0.00	1762.94	211.72
	24	5477.60	6070.54	0.00	5774.07	296.47	2334.51	1806.33	0.00	2070.42	264.09
	48	5384.33	7461.15	0.00	6422.74	1038.41	3386.11	3920.66	0.00	3653.39	267.28
	72	5999.26	7710.33	5388.44	6366.01	982.74	4652.38	5015.19	4578.61	4748.72	190.81
	96	5759.54	7504.16	4788.78	6017.49	1123.46	5544.72	6003.74	5874.89	5807.78	193.31
	120	5411.85	6468.22	5015.71	5631.93	613.07	5946.82	5781.56	7060.54	6262.97	567.99
	144	5884.80	7057.19	1276.44	4739.48	2495.07	7738.80	8131.16	2947.81	6272.59	2356.42
	168	6455.82	6434.54	0.00	6445.18	10.64	9826.32	8702.16	0.00	9264.24	562.08



Příloha IV: Závislost zprůměrovaných ploch píků na čase formy kre-alkalynu s chybovými úsečkami v různých prostředích – **A**: voda, **B**: roztok pH „džusu“, **C**: roztok pH „žaludku“ a **D**: roztok citrulinu



Příloha V: Tabulka ploch píků kreatinu a kreatininu formy tri-kreatin malátu ve čtyřech prostředích, včetně průměru a směrodatné odchylky

Typ kreatinu	Čas odběru (h)	Kreatin, plocha píku					Kreatinin, plocha píku				
		1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$	1. měření	2.měření	3.měření	$\bar{x}$	$\sigma$
Tri-kreatin malát - voda	0	7359.79	6055.02	6183.42	6532.74	587.15	10393.43	9554.94	9271.41	9739.93	476.37
	2	7093.66	6122.60	6440.37	6552.21	404.25	13154.33	11110.33	11567.29	11943.98	875.94
	4	6906.64	5700.04	6599.77	6402.15	512.03	15714.70	13113.67	14310.59	14379.65	1062.99
	8	6404.71	5896.00	6198.01	6166.24	208.89	20230.37	18858.59	18863.99	19317.65	645.39
	16	6143.26	5585.86	5399.75	5709.62	315.90	31349.84	30082.60	28590.23	30007.55	1127.86
	24	7294.90	5737.10	5808.62	6280.21	718.09	47990.23	41895.34	40849.70	43578.43	3148.69
	48	6025.40	4898.32	4963.87	5295.87	516.55	78222.76	73449.05	69959.33	73877.04	3387.08
	72	6152.55	4765.05	4721.71	5213.10	664.53	120192.65	104987.12	104087.05	109755.60	7389.25
	96	5520.50	3838.49	3685.21	4348.07	831.40	149720.22	128051.77	128002.63	135258.21	10226.21
	120	5137.43	4539.84	3930.06	4535.78	492.92	175148.20	154928.11	157794.47	162623.59	8933.21
	144	4492.76	4228.26	3974.17	4231.73	211.73	193934.83	179500.77	180575.98	184670.53	6565.54
	168	4205.57	3638.76	4205.05	4016.46	267.07	227030.09	214854.14	232504.91	224796.38	7376.97
Tri-kreatin malát - pH "džusu"	0	4510.48	4480.47	4657.52	4549.49	77.36	8691.77	8698.98	8888.35	8759.70	91.02
	2	5312.88	5397.13	5261.36	5323.79	55.96	11342.08	11554.67	10217.94	11038.23	586.49
	4	4643.93	4216.84	4338.37	4399.71	179.67	14863.81	13142.84	12734.56	13580.40	922.69
	8	2017.52	2180.36	1967.20	2055.02	90.97	10004.36	10864.32	9473.39	10114.02	573.11
	16	3335.42	3972.47	3957.94	3755.28	296.94	27889.28	30134.72	27978.05	28667.35	1038.22
	24	3552.43	3834.62	3861.32	3749.46	139.75	40748.31	41458.27	41101.79	41102.79	289.84
	48	3942.81	4117.08	4086.28	4048.72	75.94	74818.91	77579.45	82194.06	78197.47	3042.44
	72	3063.85	3331.08	3299.16	3231.36	119.16	105040.85	106299.18	113882.78	108407.60	3905.47
	96	2887.99	2779.91	2766.72	2811.54	54.33	134655.27	133242.28	143327.89	137075.15	4458.83
	120	1992.66	2383.32	2611.07	2329.02	255.37	153818.44	168405.73	160896.16	161040.11	5956.11
	144	3003.49	3058.95	3758.25	3273.56	343.47	188390.81	188612.39	197640.42	191547.88	4309.03
	168	3388.13	3673.32	3692.41	3584.62	139.16	235641.30	229731.16	246653.01	237341.82	7012.19

Tri-kreatin malát - pH "žaludku"	0	7592.51	7715.63	8220.04	7842.72	271.49	10783.88	10601.05	10648.65	10677.86	77.45
	2	7350.23	7151.49	8443.42	7648.38	568.00	10654.23	10416.22	11529.88	10866.78	478.85
	4	6908.34	7705.09	8139.09	7584.17	509.68	11122.85	12287.58	11758.95	11723.13	476.17
	8	7207.23	7213.97	8319.64	7580.28	522.81	12126.56	12114.44	12948.41	12396.47	390.31
	16	7383.01	8128.76	8691.75	8067.84	536.02	14297.81	15563.22	15642.00	15167.67	615.93
	24	7624.57	7089.12	8116.84	7610.18	419.69	17481.43	16017.23	17161.15	16886.60	628.49
	48	6999.71	7036.32	7366.04	7134.02	164.74	21736.31	21779.64	21456.49	21657.48	143.21
	72	6347.82	6664.94	6762.26	6591.67	176.95	26056.27	27150.15	25226.40	26144.27	787.83
	96	6544.97	6493.35	6251.39	6429.90	127.98	31907.29	31514.03	30361.72	31261.01	655.85
	120	6341.74	6431.02	6322.49	6365.08	47.29	37654.50	38648.67	37985.69	38096.29	413.34
	144	6295.90	6708.84	7116.87	6707.20	335.16	43668.04	44370.27	47371.51	45136.61	1606.11
	168	6623.21	7119.81	6707.93	6816.98	216.91	51054.16	55926.77	49023.00	52001.31	2896.93
Tri-kreatin malát - citrulin	0	5360.26	5305.32	5368.03	5344.53	27.91	10632.25	10638.88	10341.29	10537.47	138.75
	2	6415.39	6778.13	6450.12	6547.88	163.43	11839.47	12416.97	11787.03	12014.49	285.40
	4	7123.28	6813.82	7461.66	7132.92	264.57	14841.19	15151.86	16280.96	15424.67	618.63
	8	6040.94	6587.44	6730.51	6452.96	297.14	19414.87	20136.96	20505.96	20019.26	453.15
	16	5949.32	5922.65	5648.59	5840.19	135.92	31588.59	29944.26	30598.87	30710.57	675.92
	24	5674.05	5732.63	5801.42	5736.03	52.05	43458.73	43764.29	42917.89	43380.31	349.96
	48	4973.56	4800.13	5093.74	4955.81	120.52	80257.53	72541.91	73735.90	75511.78	3390.97
	72	4958.57	4507.48	5128.23	4864.76	261.96	113967.98	110908.46	110372.21	111749.55	1583.87
	96	4173.34	4012.83	3951.74	4045.97	93.45	136666.86	134427.22	136343.66	135812.58	988.44
	120	3436.93	3954.26	3777.41	3722.87	214.69	154806.70	150455.98	155550.25	153604.31	2246.80
	144	4459.66	3655.27	2777.53	3630.82	686.94	199386.81	191010.98	192657.91	194351.90	3623.15
	168	3298.70	3899.10	3353.71	3517.17	271.00	208540.64	209705.86	228433.00	215559.83	9115.12

Příloha VI: Závislost zprůměrovaných ploch píků na čase formy tri-kreatin malátu s chybovými úsečkami v různých prostředích – **A**: voda, **B**: roztok pH „džusu“, **C**: roztok pH „žaludku“ a **D**: roztok citrulinu

