

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení kreatinu v potravinových doplňcích

Daniel Barták

Bakalářská práce

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Daniel Barták**  
Osobní číslo: **C16005**  
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**  
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**  
Téma práce: **Stanovení kreatinu v potravinových doplňcích**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zabývající se stanovením kreatinu v potravinových doplňcích. Věnujte se i jeho vlivu na lidský organizmus.
2. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

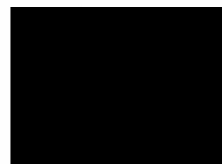
Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

L.S.



---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne

Daniel Barták

## **Poděkování:**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Aleši Eisnerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup, jenž mi věnoval při zpracovávání této práce. Velmi děkuji celé své rodině za podporu během mého studia.

## **ANOTACE**

Hlavní náplní této práce je shrnutí dostupných informací o kreatinu. První část se týká obecných informací a historii, následuje chování kreatinu v těle člověka, výrobě kreatinu, analytickým prostředkům, kterými můžeme zjistit obsah kreatinu a na závěr jsou zmíněny různé další formy kreatinu a jeho obsah v nich.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kreatin, suplementace, doplňky stravy, kreatin ve sportu

## **TITLE**

Determination of creatine in food supplements

## **ANNOTATION**

The main content of this work is a summary of available information on creatine. The first part concerns general information and history, followed by the behavior of creatine in the human body, creatine production, analysis and finally various other forms of creatine and its content in them.

## **KEYWORDS**

Creatine, supplementation, food supplements, creatine in sports

## OBSAH

1.	Kreatin .....	12
2.	Vlastnosti kreatinu .....	13
3.	Historie kreatinu .....	15
4.	Kreatin v těle.....	16
4.1.	Biosyntéza .....	17
4.2.	Fosfokreatinový systém.....	17
4.3.	Metabolismus kreatinu .....	19
4.4.	Kreatin v jídle.....	19
4.5.	Transport kreatinu v těle a jeho regulace .....	20
5.	Chemická syntéza a industriální produkce .....	21
5.1.	Syntéza kreatinu ze sarkosinátů a kyanamidu.....	21
5.2.	Syntéza kreatinu ze Sarkosinátů a O-alkylisomočoviny .....	23
5.3.	Syntéza kreatinu ze Sarkosinátů a S-alkylisothiomočoviny.....	23
6.	Chemická analýza kreatinu.....	25
6.1.	Fotometrické stanovení kreatinu .....	25
6.2.	Enzymatická analýza kreatinu .....	26
6.3.	Chromatografické metody pro určení kreatinu .....	27
6.4.	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	27
6.5.	H-NMR spektroskopie .....	28
6.6.	Infračervená spektroskopie.....	30
7.	Znečištění kreatinu.....	31
8.	Formy Kreatinu.....	33
8.1.	Kreatin Monohydrát .....	33
8.2.	Kreatin hydrochlorid .....	34
8.3.	Kreatin ethyl ester .....	34
8.4.	Kre-alkalyn.....	35

8.5. Kreatin Nitrát.....	35
8.6. Kreatin citrát.....	35
8.7. Kreatin malát .....	36
8.8. Kreatin pyruvát.....	36
9. Suplementace kreatinem a fyzický výkon .....	37
10. Nedávný vývoj.....	38
11. Závěr .....	39
12. Seznam použité literatury.....	40



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Strukturní vzorec kreatinu.....	11
<b>Obr. 2:</b> Vznik soli kreatinu.....	12
<b>Obr. 3:</b> Degradace kreatinu v rozmezí 3 dní při různých hodnotách pH.....	13
<b>Obr. 4:</b> Rozpustnost kreatinu ve vodě.....	14
<b>Obr. 5:</b> Biochemická cesta syntézy kreatinu.....	16
<b>Obr. 6:</b> Cyklování kreatinu mezi mitochondrií a cytosolem.....	17
<b>Obr. 7:</b> Schéma průmyslového procesu syntézy kreatin monohydrátu.....	21
<b>Obr. 8:</b> Metody chemické syntézy kreatinu.....	23
<b>Obr. 9:</b> Kaskáda enzymatických reakcí pro stanovení kreatinu.....	25
<b>Obr. 10:</b> Stanovení kreatinu měřením vyvíjeného peroxidu vodíku.....	26
<b>Obr. 11:</b> HPLC chromatograf kreatinu a kreatininu.....	27
<b>Obr. 12:</b> H-NMR spektrum kreatin monohydrátu.....	28
<b>Obr. 13:</b> Infračervené spektrum kreatin monohydrátu.....	29
<b>Obr. 14:</b> Znečištění kreatinu.....	30
<b>Obr. 15:</b> Potencionální kontaminanty kreatinu.....	31
<b>Obr. 16:</b> Kreatin monohydrát.....	32

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Vlastnosti kreatinu .....	12
<b>Tab. 2:</b> Různé formy kreatinu a procentuální podíl kreatinu v nich.....	36

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ANT	Adenino-nukleotidový translokátor
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IRS	Infračervená spektroskopie
KC	Kreatin citrát
KEE	Kreatin ethyl ester
KHCl	Kreatin Hydrochlorid
KK	Kreatinkináza
KM	Kreatin monohydrát
KN	Kreatin nitrát
Kr	Kreatin
Krn	Kreatinin
KrP	Kreatin fosfát
KrT1	Kreatinový transportér 1
KrT2	Kreatinový transportér 2
mtKK	Mitochondriální kreatin kináza,
NAD <sup>+</sup>	Nikotin adenin nukleotid (oxidovaná forma)
NADH	Nikotin adenin dinukleotid (redukovaná forma)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PEP	Fosfoenolpyruvát,

## Úvod

Tato bakalářská práce pojednávající o kreatinu má za úkol seznámit čtenáře s tím, co to kreatin je, popsat jeho využití, výrobu, jeho účinky na lidský organismus a shrnout analytické metody pro jeho stanovení.

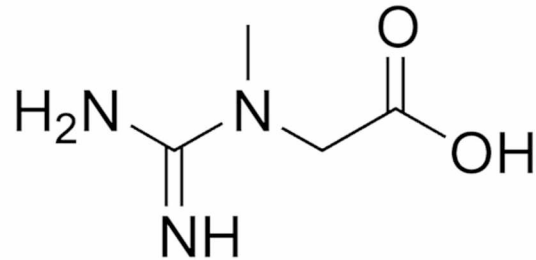
Toto téma jsem si po dohodě s vedoucím mé práce panem doktorem Alešem Eisnerem vybral, jelikož kreatin už nějakou dobu používám, je to jeden z nejprozkoumanějších doplňků stravy, při nabírání svalové hmoty a rád bych se o něm také touto formou dozvěděl více informací.

Kreatin se v posledních letech dostává do obecného podvědomí propracovanými marketingovými strategiemi, díky kterým výrobci přesvědčili veřejnost, že bez kreatinu a jeho podobným sportovním doplňkům v podstatě nemá cenu ani začínat cvičit. Na rozdíl od většiny doplňků ale užívání kreatinu, vzhledem k mnoha studiím, pomáhá zvýšit fyzickou sílu a výdrž.

## 1. Kreatin

Kreatin je jedním z nejpůvodnějších nutričních pomůcek pro sportovce. Studie trvale prokazují, že suplementace kreatinem zvyšuje jeho intramuskulární koncentraci a zlepšuje výkon při cvičení. Suplementace kreatinem může zlepšit také zotavení po cvičení a pomáhá jako prevence před zraněním [1, 2].

Studována byla také řada klinických aplikací suplementace kreatinem, zahrnující onemocnění jako je svalová dystrofie, Parkinsonova choroba, Huntingova choroba, diabetes, osteoartritida, fibromyalgie nebo mozková a srdeční ischemie [2, 3].



Obr. 1: Strukturální vzorec kreatinu [27]

Kreatin (zobrazený na obrázku 1) je přírodní, dusíkatá organická kyselina odvozená od guanidinu. V lidském organismu je polovina potřebného kreatinu produkována endogenně v játrech, ledvinách a slinivce břišní, zatímco druhá polovina je přijímána v potravě, a to hlavně v mase a rybách. Sportovci často doplňují zásoby kreatinu prostřednictvím kreatinových suplementů [1].

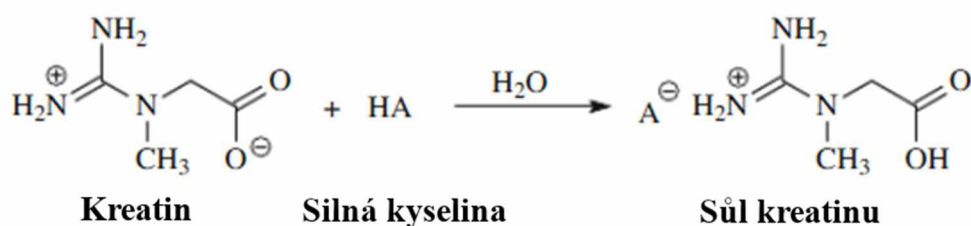
Kreatin je látka tělu vlastní a je spojován především s posilováním, ať už s redukcí váhy a spalováním tuku, tak s nabíráním svalové hmoty. Je využíván napříč všemi druhy sportů, kdy je potřeba zvýšení výbušné síly (kulturistika, bojové sporty, Americký fotbal, plavání, kanoistika...) [4, 5, 6].

Jeho účinky spočívají v tom, že může být reverzibilně fosforylován, tudíž ve svalech slouží jako zásoba energie ve formě vysoce energetického fosfátu. V případě poklesu koncentrace ATP, je jeho zásoba doplněna z kreatin fosfátu (KrP).

Kreatin je syntetizován argininem, glycinem a methioninem, a to převážně v játrech a ledvinách a v menším množství také v slinivce břišní. Uložen je primárně jako volný kreatin, nebo může být vázán na molekulu fosfátu, v kosterním svalstvu, které obsahuje 95 % veškerého kreatinu. Zbýlých 5 % obsahuje srdce, mozek a u mužů varlata [7, 8].

## 2. Vlastnosti kreatinu

Kreatin krystalizuje z vody jako monoklinické hranoly. Zadržuje jednu molekulu krystalizační vody na jednu molekulu kreatinu. Pokračující sušení při 100 °C vede ke ztrátě molekuly vody a vzniká tak bezvodý kreatin. Kreatin je slabá báze s  $pK_b$  při 25 °C o hodnotě 11,02. Výsledkem je, že kreatin může tvořit soli pouze se silnými kyselinami, které mají hodnotu  $pK_a$  menší než 3,98. Soli tvoří protonací guanidinové skupiny způsobem, který je vyobrazen na obrázku 2 [9].



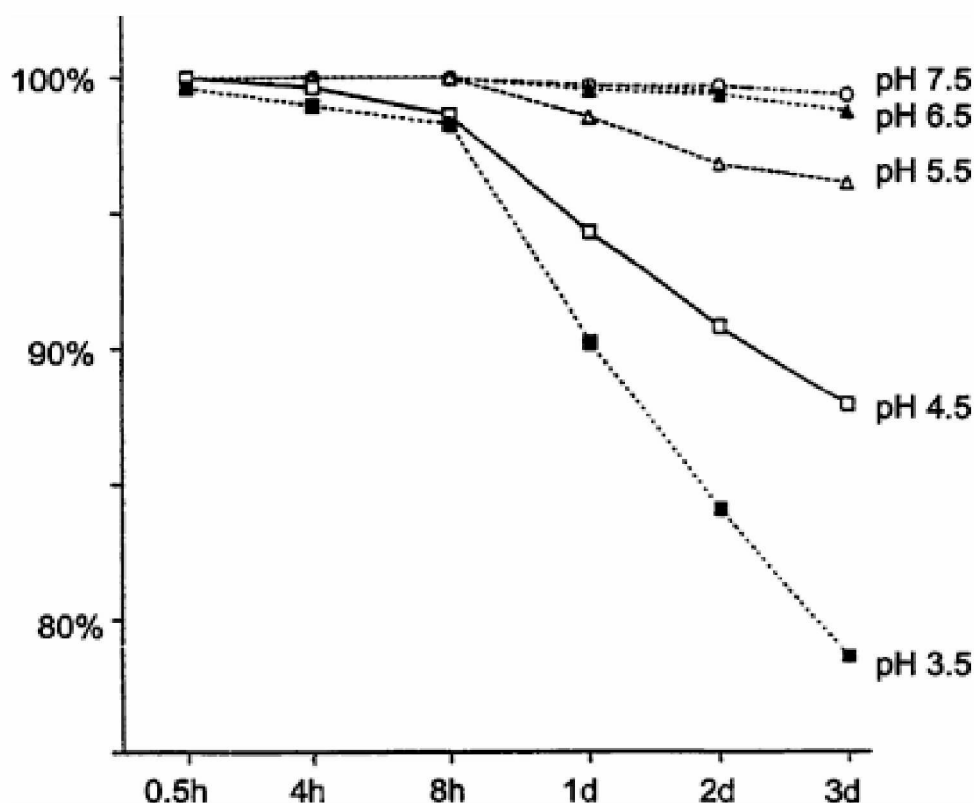
**Obr. 2:** Vznik soli kreatinu [10]

**Tab. 1:** Vlastnosti kreatinu [11]

Systematický název	<b>N-(aminoiminomethyl)-N-methylglycin</b>
Triviální název	Kreatin
Ostatní názvy	N-amidinosarkosin methylguanidinoctová kyselina
Sumární vzorec	$C_4H_9N_3O_2$
Molární hmotnost	131,13 g/mol
Teplota tání	303 °C
Hustota	1,33 g/cm <sup>3</sup>

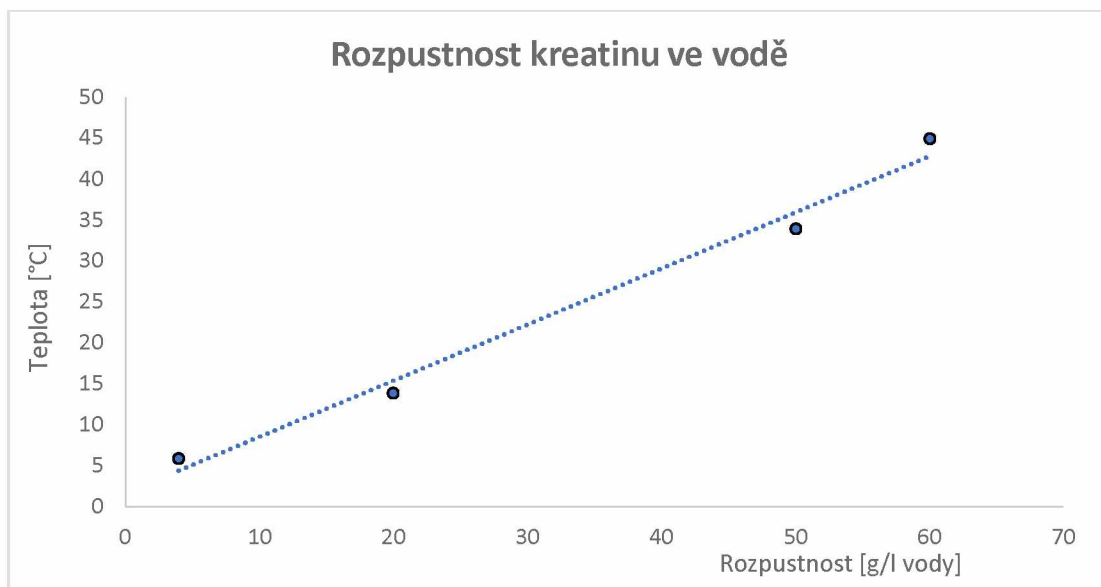
Kreatin není ve vodném roztoku stabilní kvůli jeho nitromolekulární cyklizaci na kreatinin. Rychlost degradace kreatinu není závislá na jeho koncentraci, ale na pH (čím nižší je pH, tím rychlejší degradace) a teplotě (čím vyšší teplota, tím rychlejší degradace). Tato konverze je známá jako kreatin-kreatininová rovnováha popsána již roku 1925 Egarem a Shiverem [1].

Výzkumy ukázaly, že kreatin je relativně stabilní v roztoku při neutrálním pH (6,5–7,5). Po 3 dnech skladování při 25 °C se však kreatin degraduje na kreatinin v míře 4 % při pH 5,5, 12 % při pH 4,5 a dokonce 21 % při pH 3,5 tak jak je vyobrazeno na obrázku 3. Hlavním důvodem, proč se kreatin prodává v pevné formě, je tedy degradace kreatininu na kreatinin v průběhu času. V tomto ohledu může být jeho degradace na kreatinin snížena nebo zastavena buď snížením pH pod 2,5 nebo zvýšením pH. Velmi nízké pH má za následek protonaci amidové skupiny v kreatinu a tím brání nitromolekulární cyklizaci. Proto je přeměna kreatinu na kreatinin v trávicím traktu minimální bez ohledu na dobu průchodu a absorpce do krve je téměř 100 % [12].



Obr. 3: Degradace kreatinu v rozmezí 3 dní při různých hodnotách pH [12]

Rozpustnost kreatinu ve vodě roste s teplotou, tak jako je vyobrazeno na obrázku 4 a činí jen 7 g na litr při 4 °C a 18 g na litr při 25 °C [1]. Některé doplňkové informace jsou uvedeny v tabulce 1.



**Obr 4:** Rozpustnost kreatinu ve vodě [13]

### 3. Historie kreatinu

Od ranných devadesátých let 19. století svět zaujaly zázraky suplementu, který zvyšuje atletickou výkonnost, pomáhá se stavbou svalové hmoty a má velmi málo vedlejších účinků. Kreatin je pravděpodobně jeden z nejprozkoumanějších sportovních doplňků dostupných na trhu. Historie kreatinu ale sahá až do roku 1832 kdy Francouzský filozof a vědec Michel Eugene Chevreul [14] poprvé úspěšně extrahoval kreatin z masa (z živé tkáně, jak se zmiňuje v definici). Jelikož byl kreatin nalezen v mase, rozhodl se Chevreul pojmenovat svůj objev podle řeckého slova pro maso „κρέας“ [15].

Chevreulův objev zažehl debatu o novém objevu a rozpoutal plno zajímavých studií. Inspiroval například práci německého chemika Justus von Liebiga [16]. V roce 1847 von Liebig replikoval Chevreulovu práci a extrahoval kreatin z různých druhů masa. Přišel přitom k zajímavému zjištění, že divoká zvířata mají ve svých svalech větší koncentraci kreatinu než zvířata domestikovaná. Došel díky tomu k závěru, že stupeň zátěže a aktivity jedince je v přímém úměru s množstvím kreatinu, které tělo jedince produkuje.

V druhé polovině devatenáctého století výzkum kreatinu pokračoval a pár měsíců po tom co byl Liebigův výzkum zveřejněn bylo zjištěno, že kreatinin, produkt rozpadu kreatinu, může být nalezen v moči [12].

V roce 1912 výzkumní pracovníci z Harvardovi univerzity [17] zjistili, že konzumace kreatinu může dramaticky zvýšit jeho podíl ve svalech. Navazujíc bylo na zvířatech testováno, že podávání kreatinu orálně zvyšuje retenci dusíku. To znamená, že se ve svalech kumuluje víc proteinu a dochází ke zvýšení váhy. Po tom, co byl přísun kreatinu přerušen, zvířata opět ztratila nabytou váhu.

Suplementace kreatinem poprvé získala popularitu až na začátku 90. let 20. století poté, co se olympijští atleti, kteří se účastnili sprintu a dalších vysoce intenzivních energeticky náročných sportů, domnívali, že za jejich výkon může hlavně užívání kreatinu. V roce 1996 bylo zjištěno, že na letních olympijských hrách v Atlantě užívalo kreatin přes 80 % atletů [18].

Od té doby se kreatin stal jedním z nejpoužívanějších doplňků výživy s odhadovanou celosvětovou spotřebou 2,7 milionu kilogramů ročně [19, 20].

#### **4. Kreatin v těle**

Kreatin je přírodně vyskytující se aminokyselina, jejíž primární metabolickou rolí je kombinace s fosforylovou skupinou a tvorba kreatinfosfátu, který je využíván k regeneraci ATP ve svalech. Průměrné množství kreatinu a kreatinfosfátu uložené v lidském těle je 120mmol na kilogram svaloviny. Nicméně tělo dokáže s pomocí suplementace „uskladnit“ až 160mmol na kilogram svaloviny, což je o 33 % více.

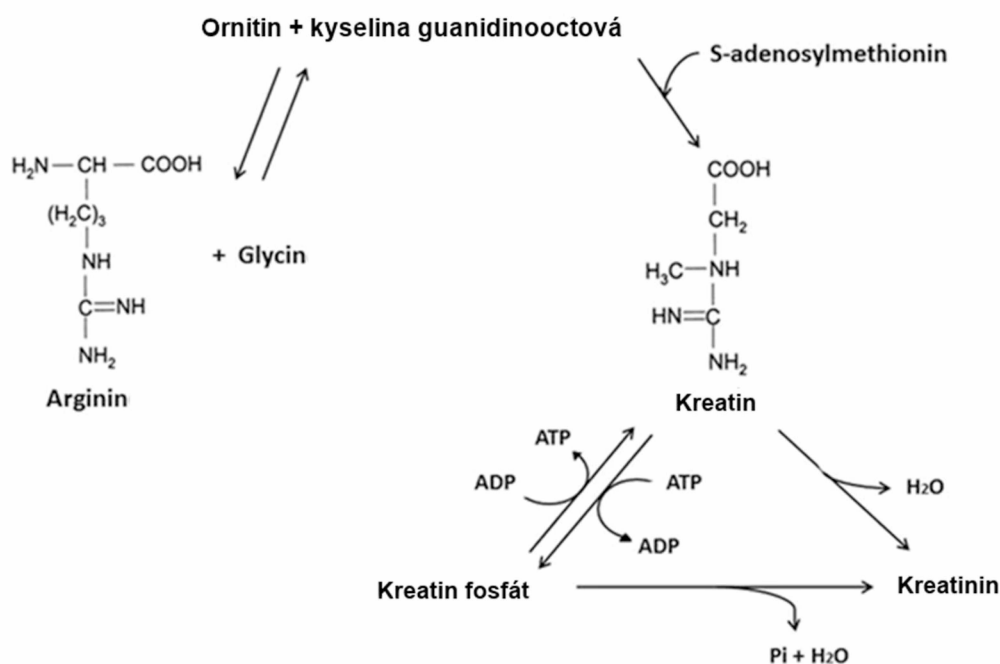
Každý den je 1-2 % kreatinu, uloženého ve svalstvu, rozloženo a tělem vyloučeno a každý jedinec by potřeboval každý den přijmout 1-3 g kreatinu, aby udržel jeho průměrné zásoby. Pro většinu lidí je postačující dávkou, kterou musí spotřebovat pouze 0,5 g za den, jelikož zbytek je syntetizován v játrech a ledvinách. [21, 22, 23]



## 4.1. Biosyntéza

Syntéza kreatinu probíhá v játrech a ledvinách. U mladého jedince je kreatin produkován průměrnou rychlostí 1 g za den a jeho biosyntéza je vyobrazena na obrázku 5. K jeho syntéze jsou zapotřebí tři aminokyseliny a to glycin, arginin a methionin a tři enzymy L arginin:glycin amidinotransferáza, guanidinoacethát:methyltransferáza a methionin:adenosyltransferáza. Dopad syntézy kreatinu na metabolismus glycinu u dospělých je nízký [8, 24].

Rychlost syntézy kreatinu se mění s věkem a u věkových skupin 20–39, 40–59 a více než 60let je odhadovaná rychlost syntézy přibližně 7,7; 5,6 a 3,7 mmol/den. U žen se střední rychlost syntézy kreatinu pohybuje okolo 70-80 % oproti mužům [1].



Obr. 5: Biochemická cesta syntézy kreatinu [2]

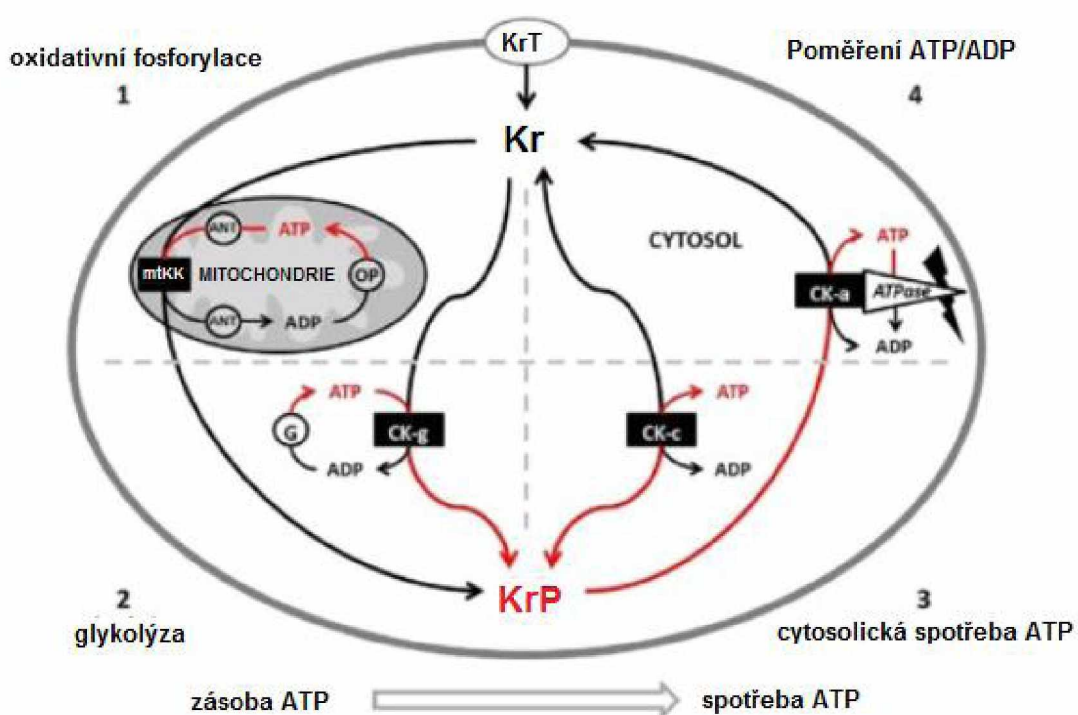
## 4.2. Fosfokreatinový systém

Kreatin je kombinován s fosforylovou skupinou pomocí enzymu Kreatinkinázy (KK). Jelikož se adenosintrifosfát (ATP) rozkládá na adenosindifosfát (ADP) a fosfátovou skupinu za uvolnění velkého množství volné energie, lze volnou energii uvolněnou hydrolýzou kreatinfosfátu na kreatin a fosfát použít k resyntéze

ATP z ADP. To pomáhá udržovat dostupnost ATP, a to zejména při maximálním úsilí anaerobního cvičení jako je například sprint.

Fosfokreatinový systém hraje také důležitou roli při přenosu energie z mitochondrií do cytosolu (viz obrázek 6) [25].

Kreatin je krví transportován do tkání s vysokou spotřebou energie jako je kosterní svalstvo nebo mozek. Koncentrace ATP ve svalech je běžně okolo 2-5 mmol/l, což by vystačilo na kontrakci svalu pouze na několik sekund. Ačkoli buněčná koncentrace ATP je malá, její změny je velmi těžké detekovat, jelikož je ATP průběžně a efektivně doplňováno z velkého množství kreatinfosfátu a kreatinkinázy. Kreatin má tedy schopnost zvýšit zásoby kreatinfosfátu ve svalech, potenciálně zvýšit schopnost regenerace ATP z ADP a tím zvýšit energetické zásoby svalu [22, 26].



**Obr. 6:** Cyklování kreatinu mezi mitochondrií a cytosolem [27]

KrT-Kreatinový transportér, mtKK-Mitochondriální kreatin kináza, ANT-Adenino-nukleotidový translokátor

### 4.3. Metabolismus kreatinu

Kreatin se v těle nachází převážně ve dvou formách a to z 60 % jako kreatinfosfát a ze 40 % jako kreatin. Nachází se převážně v kosterním svalstvu, ale může se vyplavit i do krve. Tělo se ho následně zbavuje saturací do různých orgánů a buněk nebo filtrací ledvinami [8].

Eliminace Kreatinu a kreatinfosfátu je primárně založena na jejich rozkladu na kreatinin a jeho vylučování močí. Míra ztráty kreatinu v lidském těle je asi 1,7 % denně [22]. Když zvážíme, že u 70 kg muže je tělní obsah kreatinu asi 120 g, celková denní ztráta kreatinu činí přibližně 2 g. Vzhledem k tomu, že více než 90 % kreatinu a kreatinfosfátu se nachází v kosterním svalstvu, ztráty kreatinu se liší v závislosti na pohlaví a věku. Vylučování kreatinu se během života mění téměř lineárně [1, 28].

Dosahuje maxima ve věku 18–29 let s průměrnou ztrátou 24 mg/kg za 24 h a ve věku 70–79 let činí už jen 13 mg/kg za 24 h. Ženy mají průměrné ztráty kreatinu o 20 % nižší než muži [1].

### 4.4. Kreatin v jídle

Jídlo obecně poskytuje okolo 50 % našeho denního požadavku kreatinu, přičemž tělo syntetizuje zbylých 50 %. Potraviny obsahující kreatin jsou převážně ryby a maso, přičemž koncentrace kreatinu v rybách se pohybuje okolo 4 g/kg ryb a 5 g/kg masa.

Aby bylo získáno gramové množství kreatinu, musí být zkonsumováno velké množství ryb a masa. Vzhledem k tomu, že suplementace kreatinem, jakožto potravinovým doplňkem, je velmi levná a efektivní bez nadměrného příjmu tuku nebo bílkovin, zdá se být dobrou cestou pro všechny sportovce [1, 29].

Pro vegany a vegetariány není bohužel žádná přírodní složka obsahující kreatin a mají tedy velmi málo zdrojů kreatinu v potravinách. Vegani i vegetariáni v podstatě vyžadují syntézu všeho svého kreatinu, studie ale ukázaly, že syntéza kreatinu u těchto subjektů je nedostatečná a vede k jeho snížení ve svalstvu [30].

#### 4.5. Transport kreatinu v těle a jeho regulace

Tkáně obsahující nejvyšší koncentrace kreatinu, tedy kosterní a srdeční svalstvo, obvykle nejsou schopny jej opět syntetizovat. K přenosu kreatinu slouží kreatinový transportér 1 (KrT1). KrT1 je využíván pro absorpci kreatinu do různých tkání jako jsou ledviny, srdeční sval, mozek a kosterní svalstvo. K absorpci kreatinu do tkání dochází proti koncentračnímu gradientu, jelikož jeho koncentrace v krvi se pohybuje v rozmezí od 50 do 100  $\mu\text{mol/l}$ , zatímco například jeho koncentrace v kosterním svalstvu se obecně pohybuje od 5 do 10  $\text{mmol/l}$  [1].

Existuje ještě další transportér kreatinu s označením KrT2, který je primárně aktivní a přítomný ve varlotech. KrT1 je velmi citlivý na extracelulární i intracelulární hladiny kreatinu a je velmi rychle aktivován, když se celková koncentrace kreatinu sníží. Bylo také pozorováno, že KrT1 umožňuje transport kreatinu do mitochondrií. Toto zjištění naznačuje, že v mitochondriích se nalézá další zásoba kreatinu, která hraje roli v transportním řetězci Fosfátu z mitochondrie do cytosolu [8, 29].

Přepravu kreatinu lze regulovat prostřednictvím akutních a chronických mechanismů. Akutní regulace může být způsobena změnami jeho koncentrace a Chronická může být regulována genovou expresí, translací nebo posttranslační úpravou KrT1 [22, 29].

## 5. Chemická syntéza a industriální produkce

V dnešní době je stále větší zájem o přírodní, ale i syntetické sloučeniny guanidinu zahrnující také kreatin jako potencionální farmaceutickou a také bioaktivní látku.

Lékařský výzkum a farmaceutický průmysl jsou dvě hlavní hnací síly vývoje nových syntetických drah pro peptidické molekuly, které obsahují guanidinovou skupinu a mají biologickou nebo dokonce léčivou aktivitu.

Mezi různými syntetickými cestami, které dnes známe, má většina pouze akademickou hodnotu, je užívána pouze pro laboratorní přípravu nových molekul a pouze některé by mohly být využity v průmyslovém prostředí pro produkci většího množství kreatinu [12].

### 5.1. Syntéza kreatinu ze sarkosinátů a kyanamidu

Na základě dřívějšího objevu Streckera a Volharda [31, 32] může být kreatin získán reakcí kyanamidu a sarkosinátů za použití vody, jakožto velmi levného rozpouštědla. Rovnice syntézy je zobrazena na obrázku 8 (A).

Suroviny tohoto procesu jsou snadno dostupné jako základní chemické složky. Sodné nebo draselné soli sarkosinátu jsou produkovány v průmyslovém měřítku reakcí methylaminu, formaldehydu a kyanidu sodného nebo draselného. Zatímco kyanamid je derivován z kyanamidu vápenatého, který se stal průmyslově dostupným nitrogeací karbidu vápníku, známým jako Frank-Caro proces, zavedeným okolo roku 1900 [12, 33].

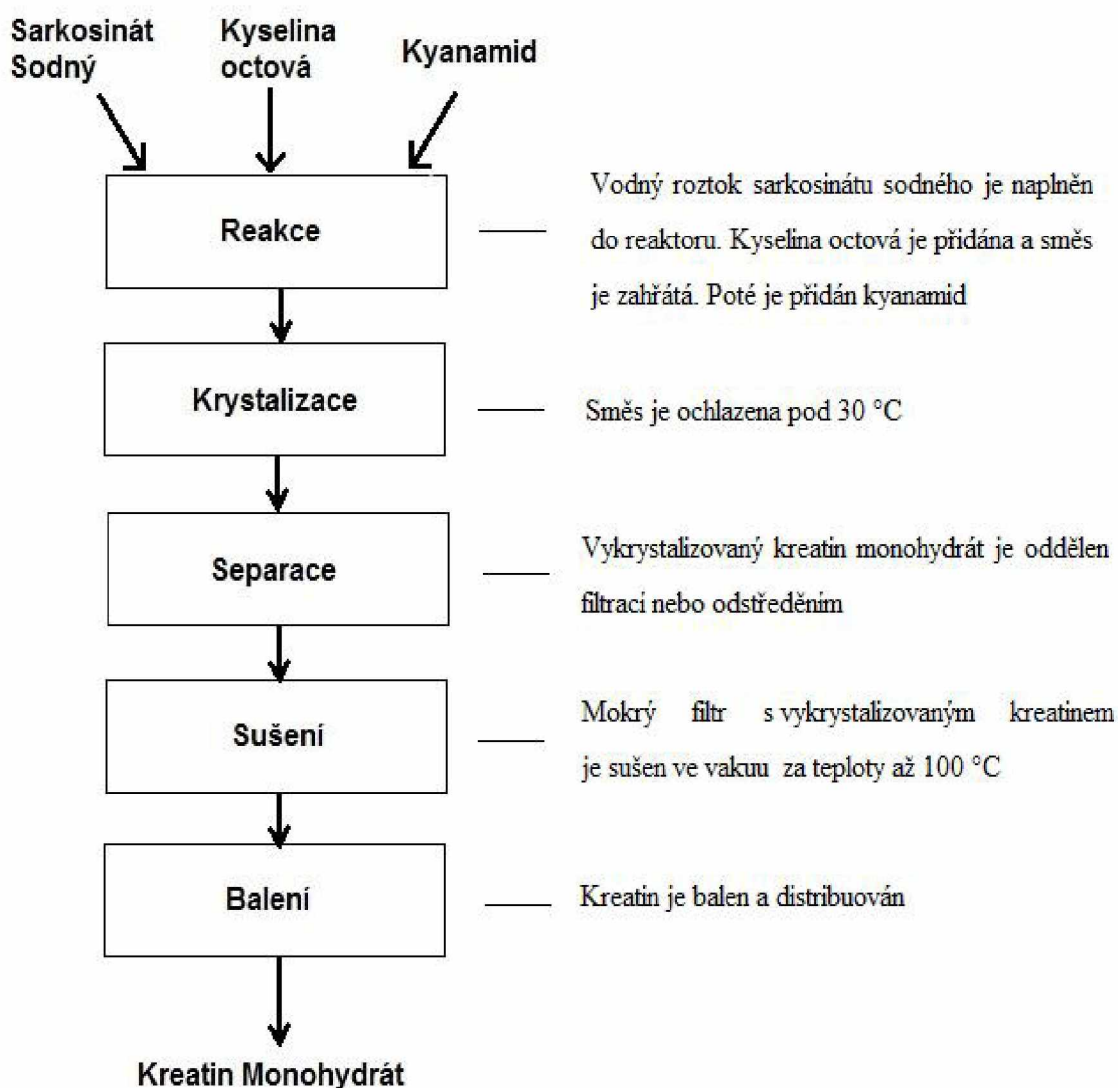
Kreatin se tímto způsobem může získávat ve velkých množstvích i vysoké kvalitě. Prostředí o pH okolo 10 je výhodné hned ze dvou důvodů: (1) dimerace kyanamidu dosahuje při tomto pH nejvyšší rychlosti. (2) Vedle tvorby dikyanamidu dochází současně k adici vody za tvorby močoviny [34].

Kreatin ve formě kreatin monohdrátu může být syntetizován nukleofilní adicí N-methylglycinu (Sarkosin) a kyanamidu následujícím postupem:

Sarkosin je za stálého míchání rozpuštěn v destilované vodě, je k němu přidán chlorid sodný a pH je upraveno na hodnotu okolo 10. Poté je ve vedlejší nádobě

rozpuštěn kyanamid ve vodě a je k němu přidáno malé množství hydroxidu amonného. Následně jsou oba roztoky za stálého míchání a smíchány a reakce se nechá v klidu běžet. Po dokončení reakce je produkt izolován vakuovou filtrací nebo v odstředivce. Na závěr je produkt promýván ledovou vodou [35].

Výtěžek tohoto procesu je okolo 75 % čistého kreatin monohydrátu (KM) a celý proces je zobrazen na obrázku 7 a rovnice popsána na obrázku 8 (B).



**Obr. 7:** Schéma průmyslového procesu syntézy kreatin monohydrátu [13]

## 5.2. Syntéza kreatinu ze Sarkosinátů a O-alkylisomočoviny

Použití O-alkylisomočoviny jako guanylačního činidla pro aminokyseliny bylo poprvé popsáno Kapfhammerem Müllerem roku 1934 [36].

Spočívá v kontinuálním zavádění O-alkylisomočoviny především O-methylisomočoviny do vodného roztoku sarkosinu při neustále udržovaném pH od 10 do 12. Tím jsou získány krystalky KM, které jsou sérií dalších kroků opakovaně promývány vodou a alkoholem [12, 37].

Z důvodu nízké rozpustnosti se O-methylmočoviny rozpouští postupně v průběhu reakce (zobrazena na obrázku 8 (C)), což vede k neustálému zvyšování teploty v průběhu reakce, čemuž se musí zabránit. Druhou nevýhodou tohoto způsobu syntézy KM je velmi nízký výtěžek reakce [38].

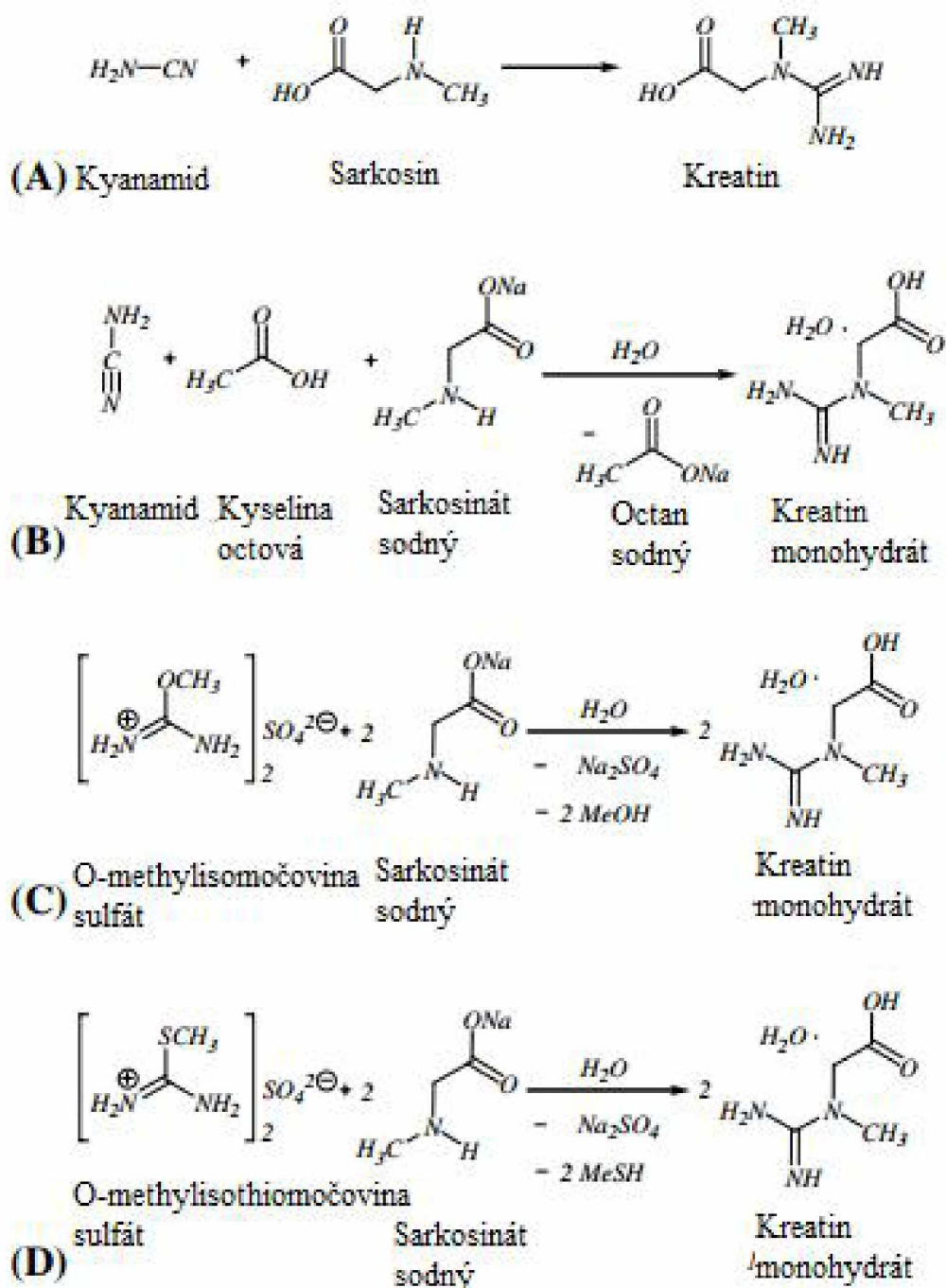
## 5.3. Syntéza kreatinu ze Sarkosinátů a S-alkylisothiomočoviny

První syntéza guanidinových kyselin z aminokyselin pomocí S-methylisothiomočoviny byla popsána Wheelerem a Merriamem roku 1903 a je vyobrazena na obrázku 8 (D) [39].

Ačkoliv guanylační činidlo je snadno dostupná a nenákladná látka, reakce má nevýhodu methyl merkaptanu, nebezpečného plynu, toxického pro životní prostředí, který musí být zničen před vypuštěním reakční nádoby, po dokončení reakce.

Čínský patent popisuje způsob chemické výroby kreatinu, který může být shrnut následovně: Na zředěný nezpracovaný roztok N-methylglycinátu sodného je za míchání a chlazení pod 15 °C přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková, dokud pH není stabilizováno na optimální úroveň 9,5. Při teplotě nepřesahující 35 °C je poté za stálého míchání do roztoku přidán S-methylisothiomočovina sulfát. Reakce je u konce při udržení teploty při 30 °C po několika hodinách. Následně je do reakčního roztoku přiváděna horká pára a krystalická hmota je oddělena odstředivou silou v centrifuze následovanou několika kroky promývaní kyselinou, alkoholem a vodou. Po sušení látky ve vakuu při teplotě 40 °C se získá KM s výtěžkem 72 % a čistotou (HPLC) 99,3 % [12].

Patent z roku 2001 pro výrobu KM ve směsi vody a alkoholu jako rozpouštědla uvádí, že při syntéze se při 15–140 °C a pH 7–13 získává KM s mnohem vyšší čistotou a za mnohem nižší cenu než u předchozích patentů [40].



**Obr. 8:** Metody chemické syntézy kreatinu [12]

(A) Syntéza kreatinu podle Streckera a Volharda (B) Syntéza kreatinu ze Sarkosinátu a kyanamidu (C) Syntéza kreatinu ze sarkosinátu sodného a O-methylthiomočoviny (D) Syntéza kreatinu ze sarkosinátu sodného a O-methylthiomočoviny



## 6. Chemická analýza kreatinu

Pro kreatin byly již vyvinuty různé analytické metody. Již brzy po objevení kreatinu byla zavedena gravimetrická analýza, která je založena na tvorbě nerozpustné sraženiny po reakci s určitým činidlem, následně je sraženina oddělena a vyhodnocena její hmotnost, ta je přímo úměrná obsahu kreatinu ve vzorku [12].

Potřeba diagnostiky nízkých koncentrací organických látek měla za následek vývoj širokého spektra nových analytických metod a gravimetrie se brzy stala zastaralou. V dnešní době je pro stanovování kreatinu v biologických vzorcích používána plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo například infračervená spektroskopie (IRS) [12, 41, 42, 43].

### 6.1. Fotometrické stanovení kreatinu

Fotometrie je analytická metoda využívající světelného záření. U analytických chemiků je fotometrie většinou spojována s měřením absorbance za účelem kvantifikace stanovovaného vzorku pomocí specifických přístrojů zvaných fotometry [44].

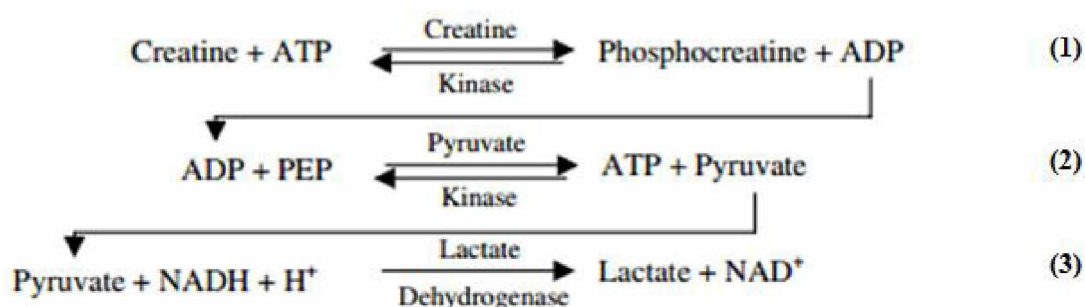
První metody měření kreatinu v krevní plazmě byly zveřejněny před více než stoletím. Dnes, Jaffeho reakce používající pikrát, zůstává po neustálém zdokonalování základním kamenem většiny současných rutinních metod [45].

Fotometrické stanovení kreatinu může být provedeno Folinovou metodou [46], která je založena na Jaffeho barevné reakci kreatinu a kyseliny pikrové v zásaditém prostředí.

Kreatin a kyselina pikrová tvoří oranžovo-červený komplex měřitelný při vlnové délce 500 nm. Vzorek je nejprve proměřen a tím je získána hodnota kreatininu v krvi. Poté je na kreatinin převeden kreatin pomocí malého množství kyseliny a je vytvořen komplex. Rozdíl těchto dvou hodnot udává hodnotu kreatinu. Tato metoda je stále běžně používána při analýze kreatinu v biologických vzorcích jako je například krev, moč nebo tkáň [12].

## 6.2. Enzymatická analýza kreatinu

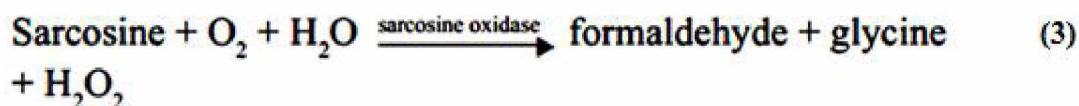
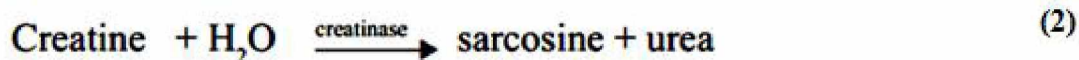
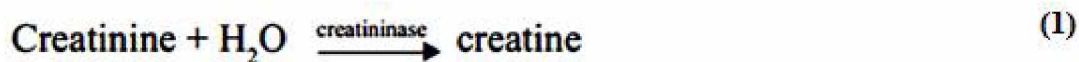
Roku 1970 [46] byla popsána metoda zobrazená na obrázku 9, založená na výzkumu Tanzera a Gilvarga z roku 1959 [47] při které je kreatin přeměněn pomocí ATP a KK na kreatinfosfát (1), následně je ADP s pomocí PEP přeměněn na ATP (2) a v posledním kroku se redukuje  $\text{NADH} + \text{H}^+$  na  $\text{NAD}^+$  (3). S tím související úbytek  $\text{NADH} + \text{H}^+$  je fotometricky měřen při vlnové délce 340nm a je přímo úměrný koncentraci kreatinu [12].



**Obr. 9:** Kaskáda enzymatických reakcí pro stanovení kreatinu [12]  
 Fosfoenolpyruvát, NADH-Nikotin adenin dinukleotid (redukováná forma)  
 $\text{NAD}^+$  Nikotin adenin nukleotid (oxidovaná forma)

PEP-

Další enzymatická analýza vyvinuta australskými biochemiky zobrazená na obrázku 10 zahrnuje inkubaci pouhých 100  $\mu\text{l}$  vzorku po dobu jedné hodiny v odměrné baňce obsahující směs kreatininázy a kreatinázy a sarkosin oxidázy. V prvním kroku je veškerý kreatinin přeměněn na kreatin pomocí kreatininázy (1), následně je kreatin pomocí kreatinázy přeměněn na sarkosin a močovinu (2), vniklý sarkosin je poté oxidován sarkosin oxidázou na formaldehyd, glycin a peroxid vodíku (3). Přesnost této metody je srovnatelná s přesností HPLC. Enzymy použité v tomto testu nyní tvoří základ nejspecifičtější metody, která je popsána rovnicemi níže. A je při ní měřen produkovaný peroxid vodíku [45].



Obr 10: Stanovení kreatinu měřením vyvíjeného peroxidu vodíku [45]

Jaffeho metoda a enzymatické metody jsou dvě nejběžnější metody měření kreatininu v plazmě. Jaffeho metoda je sice levnější, na druhou stranu není tak přesná a je velmi náchylná na rušení jinými sloučeninami [48].

### 6.3. Chromatografické metody pro určení kreatinu

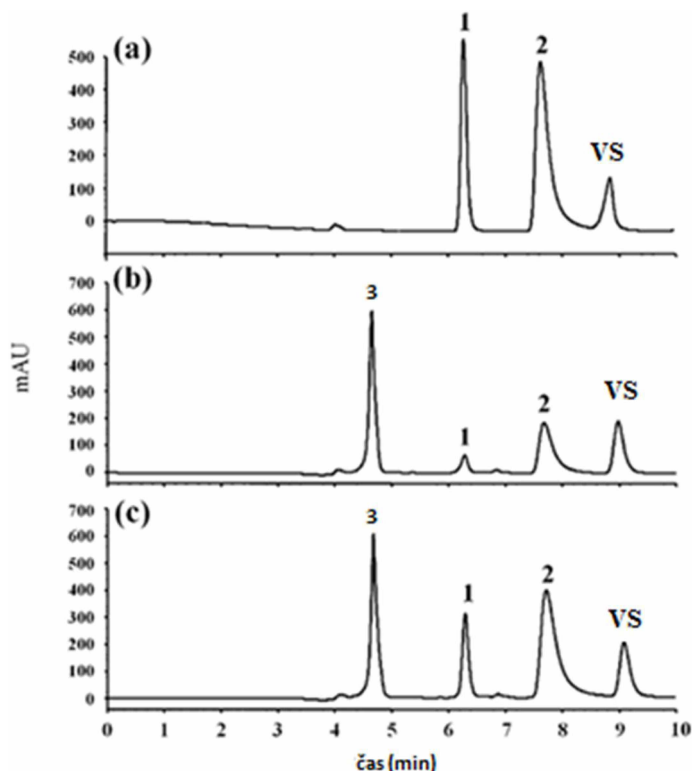
HPLC je forma kolonové chromatografie, která pod tlakem čerpá vzorek rozpuštěný v rozpouštědle neboli mobilní fázi, přes kolonu se stacionární fázi. Rychlost průchodu kolonou určují jak vlastnosti vzorku, rozpouštědla tak povaha stacionární fáze. Při průchodu vzorku kolonou, látky s nejsilnějšími interakcemi se stacionární fázi opouští kolonu nejpomaleji, což znamená, že vykazují nejdelší retenční časy. Naproti tomu vzorky vykazující malou interakci s materiálem kolony se eluují rychle a jsou tedy charakterizovány krátkými retenčními časy [49, 50].

V dřívějších dobách byla pro detekci kreatinu využívána hlavně papírová a tenkovrstvá chromatografie, ale ty už v dnešní době nehrají významnou roli, jelikož byly vyvinuty pokročilejší metody stanovení, které jsou popsány dále [12].

### 6.4. Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC stanovení kreatinu může být dosaženo například metodou, která je zároveň vhodná pro souběžné stanovení potenciálních nečistot jako je dikyandiamid, kreatinin nebo dihydrotriazin a je vyobrazena na obrázku 11. Mobilní fáze se skládá z 0,2M vodného roztoku dyhydrogenfosforečnanu amonného o upravené hodnotě pH 4 pomocí kyseliny fosforečné. Chromatografické separace je dosaženo při teplotě

okolí v koloně 5 SA (ET 250/4,6mm NUCLEOSIL 120-10, C18). Průtok je udržován na 1 ml/min a eluát je monitorován při vlnové délce 225nm. Koncentrace kreatinu je nadále vypočítávána porovnáním s externími standardy. Retenční čas kreatinu je přibližně 3,5min. Popsaný způsob se vyznačuje vysokou selektivitou, linearitou ve velkých koncentračních rozsazích a vysokou selektivitou pro molekuly kreatinu. Výsledky jasně ukazují na dobrou metodu a na dobrou separaci kreatinu v komplexních maticích jako je lidská moč a plazma [12, 41, 51].



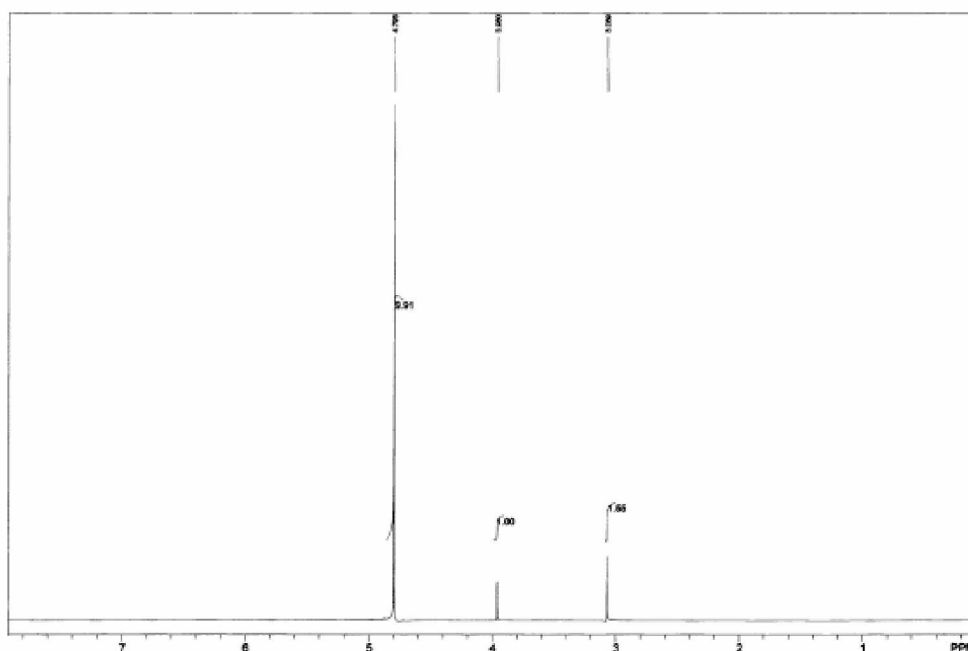
**Obr. 11:** HPLC chromatograf kreatinu a kreatininu [52] (a) standardy (b) vzorek moči (c) vzorek moči obohacený o standardy 1-kreatin, 2-kreatinin, 3-hypoxantin, VS-vnitřní standard

## 6.5. H-NMR spektroskopie

Nukleární magnetická rezonance neboli NMR je nedestruktivní analytická metoda založená na magnetických vlastnostech atomového jádra. Umožňuje určit počet, typ a relativní pozici určitých atomů v molekule a jsou díky ní získávány fyzikální, chemické, elektronické a strukturální informace o zkoumané molekule. Používá se jako kontrola kvality, zkoumání čistoty a pro zjištění molekulové struktury vzorku. Spektrum NMR lze pozorovat pouze u jader která mají rotaci. Pokud je na molekuly aplikováno vnější magnetické pole, je možný přenos energie ze základní, na

energetickou hladinu vyšší (obvykle o jednu úroveň). Když se energie poté vrací na základní úroveň je emitováno záření o určité vlnové délce. Vlnová délka vykazovaného záření odpovídá množství energie, která byla v předešlém kroku spotřebována na přeskok na vyšší energetickou hladinu [53, 54].

V následující studii využívající NMR byla pozorována změna obsahu kreatinu v potkaním mozku před a po 10 dnech perorální suplementace kreatinem. Potkani byly rozděleni do dvou skupin. První porovnávací skupina suplementaci nedostávala a druhá přijímala 2,6 g kreatinu na kilogram váhy denně. Měření byla provedena jak in vivo, tak in vitro. Po deseti dnech bylo v potkanech, kteří přijímali kreatin, vyhodnoceno zvýšení obsahu kreatinu in vivo o 4,7 % a in vitro o 9,3 %, oproti skupině porovnávací, u které hodnoty kreatinu zůstaly na stejných hodnotách [55].



**Obr. 12:** H-NMR spektrum kreatin monohydrátu [12]

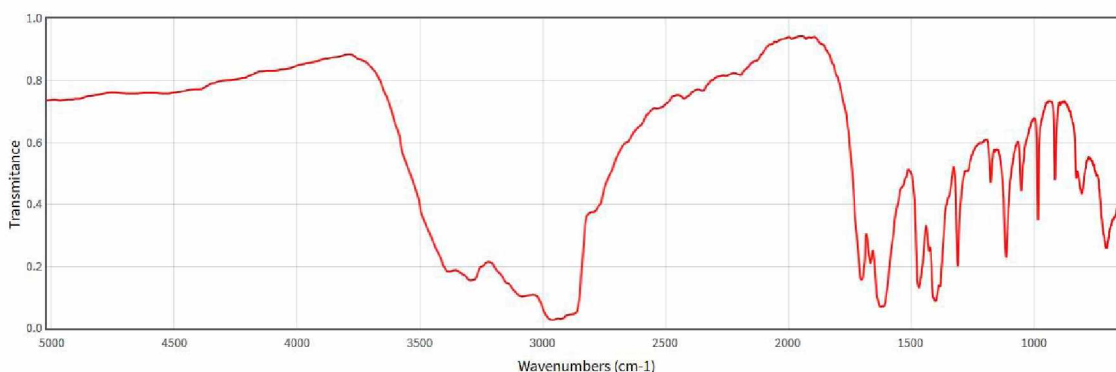
Nejdůležitější pro NMR analýzu jsou atomy vodíku ( $^1\text{H}$ ), uhlíku ( $^{13}\text{C}$ ) a fosforu ( $^{31}\text{P}$ ).

Obrázek 12 ukazuje píky na 3,069 ppm a 3,960 ppm jsou způsobeny protony skupiny N-CH<sub>3</sub> a methylen protony acetátové skupiny. Signál na 4,795 ppm reprezentuje součet protonů NH [12].

## 6.6. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je jednou z nejdůležitějších analytických technik, které jsou dnes k dispozici vědcům v potravinářském průmyslu. Poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace rychlým, cenově nenáročným a nedestruktivním způsobem, nevyžaduje použití znečišťujících chemikálií a může být prováděna i minimálně školeným personálem [56].

IRS je analytická metoda využívající část elektromagnetického záření s větší vlnovou délkou a o menší frekvenci, než je viditelné světlo. Působením tohoto spektra na vzorek jsou molekuly rozvibrovány a každá funkční nebo strukturní skupina molekuly vibruje o jiné frekvenci, což je využíváno pro jejich identifikaci [12, 57].



**Obr. 13:** Infračervené spektrum kreatin monohydrátu [X]

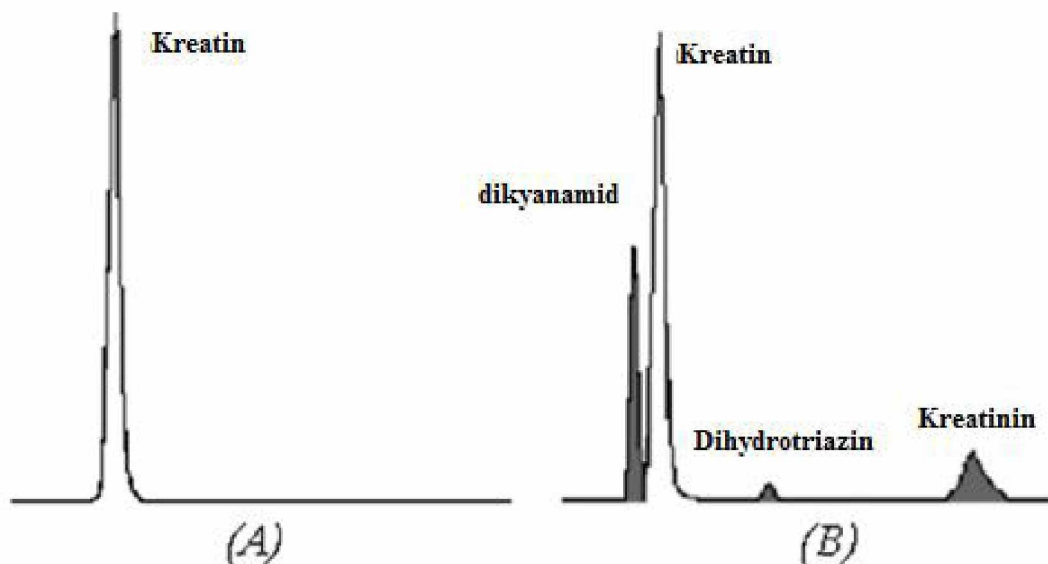
Ve Studii z roku 2012 bylo zkoumáno využití IRS pro stanovení obsahu kreatinu v svalstvu u potkanů. Potkanům byla podávána dávka 5 g kreatinu denně po dobu jednoho týdne a poté byla na dalších 8 týdnů dávka snížena na 1 g na kilogram váhy denně. Po ukončení suplementace byl výsledek poměřen s detekcí HPLC. Bylo prokázáno, že IRS může monitorovat obsah kreatinu v potkaním svalstvu. Pokud by toto pozorování bylo potvrzeno dalšími technikami považovanými za zlatý standart, mohla by se IRS ukázat jako alternativní technika pro detekci účinku kreatinu v kosterním svalstvu [42].

## 7. Znečištění kreatinu

Bohužel i v běžně dostupných doplňcích kreatinu jsou nalézány nezanedbatelné hodnoty různých kontaminantů. Kreatin je získáván z přírodních zdrojů jako je sarkosin, který je běžně obsažený ve zvířecích svalech. A při komerční výrobě KM je použit kyanamid. Z toho důvodu jsou generovány i další vedlejší produkty jako jsou dikyandiamidy, dihydrotriaziny nebo kreatinin a pro ochranu spotřebitele musí být definovány jejich maximální tolerované koncentrace [23].

Analytické metody popsané výše jsou nástroji pro zkoumání syntetizovaných produktů jako je KM a jeho deriváty. To zahrnuje jak hodnocení kvality produktu, konkrétněji jeho čistoty, tak detekci možných nečistot.

Vzhledem k poměrně vysokému množství KM, který bývá spotřebován jakožto sportovní doplněk nebo jako doplněk stravy při určitých nemocech. Je zřejmé, že i malé podíly cizích látek, vedlejších produktů nebo nečistot, mohou být velmi škodlivé.



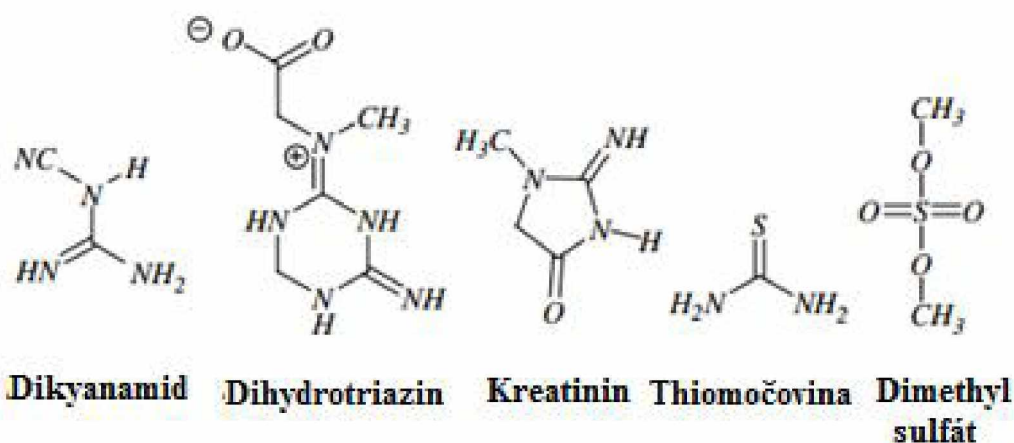
**Obr. 14:** Znečištění kreatinu [12]  
(A) Čistý suplement (B) Znečištěný suplement



Jak je popsáno v jedné z předchozích kapitol, v současné době je využíváno několika procesů pro výrobu KM v průmyslovém měřítku. Proto může být kreatin kontaminován specifickými nečistotami v závislosti na použitém procesu. Obrázek 14 zobrazuje rozdíl čistého a znečištěného suplementu [12].

Kontaminace těžkými kovy, jejichž toxicita je dobře známá, je bohužel také možná. Zdroj kontaminace může být spojen s různými příčinami. Může pocházet ze surovin, činidla nebo rozpouštědla použitého k jejich výrobě, z potrubí, vybavení či kontejneru kde jsou produkty skladovány nebo baleny. Vzorce některých kontaminantů kreatinu jsou zobrazeny na obrázku 15 [58].

U produktů uváděných a trh, bylo zjištěno, že některé jsou čisté, některé ale obsahují následující úrovně nečistot: až 5,5 % dikyanamidu, 0,1 % dihydrotriazinu a 1,4 % Kreatininu. Tyto hladiny byly proměřeny metodou HPLC a jsou vyobrazeny na obrázku 13. Kromě toho byly zjištěny zvýšené hladiny těžkých kovů jako je rtuť a olovo. Znečištění může být vysvětleno špatně řízenou syntézou nebo nedokonalým přečištěním produktu během výroby. Vzorce některých potenciálních kontaminantů jsou vyobrazeny níže na obrázku.14.Chemické mechanismy pro tvorbu vedlejších produktů byly objasněny a následně i experimentálně potvrzeny [12].



**Obr. 15:** Potencionální kontaminanty kreatinu [12]



## 8. Formy Kreatinu

V průběhu let se na trh dostalo mnoho nových forem kreatinu, které se liší způsobem výroby, stylem dávkování nebo obsahem kreatinu, přičemž každá z nich přislíbuj, že je lepší než původní KM [59].

Většina forem kreatinu vychází z KM a ať už byly mikronizovány, pufrovány, zkapalněny nebo esterifikovány všechny slibují, že dosáhnou vynikajících výsledků. V některých případech dokonce s mnohem menší dávkou, než je doporučeno pro monohydrátovou formu [3, 60].

### 8.1. Kreatin Monohydrát

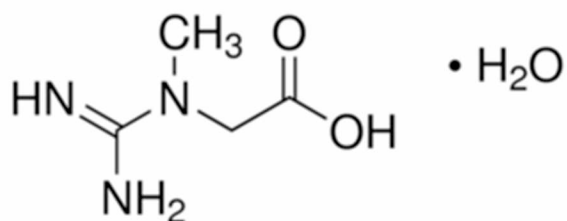
KM zobrazený na obrázku 16 je nejběžnějším typem kreatinu na trhu. Je to také forma, která byla vědecky nejvíce zkoumána a testována odborníky v mnoha studiích. Patří mezi nejúčinnější, nejbezpečnější a nejuznávanější doplňky stravy.

V podstatě to znamená, že většina vědeckých účinků kreatinu byla pozorována právě při konzumaci monohydrátu [3, 9, 62].

KM se skládá z jedné molekuly kreatinu a jedné molekuly vody. Při jeho komerční výrobě jsou však používány různé způsoby přípravy. Pokud je molekula vody odstraněna, jedná se o bezvodý kreatin a odstranění této molekuly vody zvyšuje množství kreatinu v jedné dávce produktu. Bezvodý kreatin obsahuje 100 % (hm.) kreatinu, zatímco klasický KM obsahuje přibližně 90 % (hm.) čistého kreatinu.

Mezi další formy patří mikronizovaný kreatin a také mechanicky zpracovaný kreatin, které mají lepší rozpustnost ve vodě. Teoreticky je možné, že lepší rozpustnost produktu vede k rychlejší absorpci látky v těle, to ale není dostatečně potvrzeno[63].

Studie ukázaly, že suplementace KM zvyšuje hladinu kreatinfosfátu ve svalech o 10–40 % a dopad na výkon je běžně spojován s koncentrací kreatinfosfátu ve svalovině. Akutní a chronická suplementace KM tedy zlepšuje výkon, především při vysoké intenzitě cvičení a podporuje hmotnostní zisky bez tuku [9].



Obr. 16: Kreatin monohydrát [61]

## 8.2. Kreatin hydrochlorid

Kreatin hydrochlorid (KHC1) je jednou z forem kreatinu, která je velmi oblíbená, jelikož přidáním hydrochloridové skupiny do molekuly kreatinu snižuje jeho pH a stává se kyselejším. Tato skutečnost drasticky zvyšuje jeho rozpustnost v tekutinách, což řeší jeden z problémů, který s sebou KM nese. V laboratořích bylo prokázáno, že KHC1 je v tekutině asi čtyřicetkrát rozpustnější než KM [64, 65].

Zdá se, že jeho rozpustnost ve střevním traktu je také větší než KM, což by mohlo zlepšovat jeho biologickou dostupnost, studie však zvýšenou biologickou dostupnost nepotvrzují [66, 67].

## 8.3. Kreatin ethyl ester

Pro maximální absorpci kreatinu bylo vyvinuto mnoho jeho forem, které zvyšují ať už jeho rozpustnost ve vodě, snižují jeho nutnou dávku při suplementaci, nebo v podobě kreatin ethyl esteru (KEE), který údajně zvyšuje biologickou dostupnost kreatinu.

Při studii z roku 2009 byl vzorek lidí rozdělen do tří skupin cvičenců, kdy jedna užívala KEE, jedna KM a jedna pouze placebo. V průběhu času byly pozorovány významné změny ve složení těla, obsahu vody v něm a zvýšení síly, ale nebyly pozorovány významné rozdíly mezi skupinami užívajícími KM a KEE. Závěrem lze říci, že ve srovnání s KM i skupinou užívající placebo neposkytl KEE větší benefity při zvyšování hladin kreatinu ve svalech ani při zlepšení složení těla, svalové hmoty či síly. Zlepšení těchto proměnných lze pravděpodobně přičíst spíše samotnému cvičebnímu plánu, který všechny skupiny dodržovaly než suplementací KEE [38].

Ve srovnání KEE s KM, bylo zjištěno, že KEE je dokonce méně stabilní než KM. Byl učiněn závěr, že přidáním ethylové skupiny je snížena jeho stabilita a urychlena degradace na kreatinin. Degradace v kyselém prostředí zahrnuje intramolekulární hydrolyzu karboxylové skupiny a rychlost degradace závisí na odpadávající skupině. Methylester a ethylester jsou skupiny, které odpadávají snadněji než hydroxylová skupina nebo voda, což naznačuje, že degradace na kreatinin by měla být rychlejší [9, 69].

## **8.4. Kre-alkalyn**

Kre-alkalyn je forma kreatinu, která byla uvedena na trh jako účinnější a bezpečnější forma kreatinu., která obsahuje mírně alkalický prášek (např. uhličitán sodný, fosforečnan hořečnatý, hydrogenuhličitán). Přidáním tohoto, pufrování se vytváří mírně alkalická sloučenina, která může redukovat rozklad kreatinu v žaludku, snížit degradaci na kreatinin zlepšit absorpci kreatinu do svalu a celkově zlepšit biologickou dostupnost.

Studie z roku 2012 uváděla podobná zlepšení výkonu u subjektů, které užívaly 5 g KM po dobu 28 dní a u těch které užívaly nízkou dávku (1,5 g) kre-alkalynu denně. Výsledek studie říká, že ani menší dávka doporučená výrobcem, ani stejná dávka jako KM nepodporovali větší změny obsahu kreatinu ve svalu, síly nebo anaerobní kapacity než KM. Toto zjištění vyvrací tvrzení, že Kre-alkalyn je účinnější forma kreatinu [70, 71].

## **8.5. Kreatin Nitrát**

Kreatin nitrát (KN) byl na trh uveden přibližně před šesti lety. Obecně se vytváří kombinací molekuly kyseliny dusičné a molekuly kreatinu, dokud nevykrytalizuje na kreatin dinitrát nebo kreatin trinitrát. Alternativně se může tvořit s pomocí kyseliny dusité namísto kyseliny dusičné za poskytnutí KN. Důvodem kombinace kreatinu s dusičnanem je teoretické zvýšení absorpce, a tedy i účinnosti kreatinu. Přestože KM a KN byly studovány pouze nezávisle na sobě, o účincích suplementace KN je známo méně a někteří odborníci vyjádřili obavy z možných zdravotních rizik. Studie však uvádí, že požití 1–2 g/den KN po dobu 28 dní se zdá být bezpečné u zdravých jedinců [72, 73].

## **8.6. Kreatin citrát**

Kreatin citrát (KC) se vyrábí kombinací kreatinu s organickou kyselinou citronovou. Studie mezinárodní společnosti pro sportovní výživu z roku 2007 však nezjistila žádné významné rozdíly v absorpci KC ve srovnání s KM. KC je však rozpustnější ve vodě [74, 75].

## **8.7. Kreatin malát**

Kreatin malát je vázaný na organickou kyselinu běžně vyskytující se v ovoci, kyselinu jablečnou. Samotná kyselina jablečná může u sportovců zlepšit výkon a výdrž, což vedlo výrobce ke kombinaci kyseliny s kreatinem.

Kreatin malát byl ověřen ve dvou studiích, které naznačují, že zlepšuje anaerobní produkci ATP. Na druhou stranu, nevypadá to, že by měl větší vliv na tvorbu svaloviny než KM [76, 77].

## **8.8. Kreatin pyruvát**

Ukázalo se, že anorganické soli kyseliny pyrohroznové mohou při požití ve větším množství zlepšit u potkanů výdrž a následně byl kreatin kombinován s kyselinou pyrohroznovou za vzniku Kreatin pyruvátu. Dvě studie zkoumající vytrvalostní cvičení ukázaly při suplementaci kreatin pyruvátem smíšené výsledky. Při dávkách 7 g denně po dobu 7 dní se neukázal prakticky žádný dopad na výkon ani vytrvalostní kapacitu, zatímco při suplementaci 7,5 g denně po dobu 5 dní ukázala zvýšenou rychlost pádlování a snížení koncentrace laktátu ve svalech při olympijské kanoistice, což naznačuje zlepšení aerobního metabolismu. Některé studie rovněž naznačují, že ve srovnání s KM má kreatin pyruvát vyšší obsah kreatinu v krvi. Toto zjištění není velmi pozitivní, jelikož by mohlo znamenat nižší koncentraci kreatinu ve svalech, což není efektivní [74, 75].

**Tab. 2:** Různé formy kreatinu a procentuální podíl kreatinu v nich [1]

Formy kreatinu	Podíl kreatinu [%]	Rozdíl oproti CM [%]
Bezvodý kreatin	100	13,8
Kreatin monohydrát	87,9	0
Kreatin ethyl ester	82,4	-6,3
Kreatin Malát (3:1)	74,7	-15
Kreatin methyl ester	72,2	-17,9
Kreatin citrát (3:1)	66	-24,9
Kreatin malát (2:1)	66	-24,9
Kreatin pyruvát	60	-31,7
Kreatin a-amino butyrát	56,2	-36
Kreatin a-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
Kreatin dekanoát	43,4	-50,7
Kreatin glukonát	40,2	-54,3

## 9. Suplementace kreatinem a fyzický výkon

Perorálním podáváním kreatinu nebo požitím velkého množství ryb a masa, může být zvýšena celková zásoba kreatinu v těle. V kombinaci s cvičebním programem může zvýšit výkon cvičení více než cvičení samotně [50].

Ze studie vyplývá, že suplementace kreatinem v kombinaci se svalově náročným tréninkem vede ke zvýšení fyzické výkonnosti, redukcii tuku a formaci svaloviny. V poslední době analýzy ukázaly, že suplementací kreatinem v kombinaci se silovým tréninkem může být dosaženo zvýšení jednorázového maxima na dřep o 8 % až 14 % [78, 79].

Nejedná se ale pouze o zvýšení jednorázového maxima. Kreatin podporuje celkovou pracovní kapacitu svalů a má vliv na špičkový výkon. Vrcholoví sportovci zaměřující se na získání síly a budování svalstva jsou obvykle uživateli kreatinu a některé důkazy naznačují, že suplementací kreatinem lze také získat výhody při vytrvalostních sportech. Konkrétně nebylo zjištěno, že by měl kreatin účinky spojené s během delším než 5000 m, ale výkony sportovců mohou být zlepšeny při běhu na kratší vzdálenosti pod 2000 m [80, 81].

Na základě osmotických účinků kreatinu bylo také spekulováno o jeho využití ve sportu, jakožto strategie pro uchování hydratace a minimalizace ztráty potu. Nicméně, navzdory skutečnosti, že některé účinky kreatinu na termoregulaci a kardiovaskulární reakce byly hlášeny, nezdá se, že by významně ovlivnily svalovou pracovní kapacitu v horkém prostředí. Další studie selhaly v pozorování jakéhokoliv účinku kreatinu na termoregulaci [1, 82, 83, 84].

## **10. Nedávný vývoj**

V posledním desetiletí bylo popsáno mnoho inovací, které pomáhají překonat technická omezení, která kreatin nese. Jednou z hlavních překážek, kterou představuje je jeho nízká rozpustnost ve vodě. Řešením tohoto problému byla formulace rozpustnějších solí kreatinu a komplexů na bázi mono-, di- nebo trikarboxylové kyseliny za vzniku například citrátu, malátu, fumarátu, tartrátu, pyruvátu, askorbátu nebo orotátu kreatinu. Některé z těchto nových chemických sloučenin mají kromě vyšší rozpustnosti i další synergické účinky, například výkon zvyšující účinky kreatinu společně s antioxidačními vlastnostmi kyseliny askorbové. Kreatin hydroxycitrát může být užíván jako doplněk stravy za účelem redukce váhy a potlačení chuti k jídlu a zároveň ke zlepšení svalové výkonnosti. KC může být použit ve formě šumivých tablet [12].

## 11. Závěr

Předložená bakalářská práce se věnuje Kreatinu. V úvodu práce jsou uvedeny základní informace o kreatinu následované krátkou historií, metabolickými pochody, které v těle při syntéze i degradaci kreatinu probíhají, různými cestami chemické výroby a několika analytickými metodami pro stanovení kvality a kvantity Kreatinu. Na závěr jsou zmíněné různé formy kreatinových doplňků, obsah kreatinu v nich, a možnými nečistotami, které kreatin může obsahovat.

Používání kreatinu jako doplňku výživy při cvičení s vysokou zátěží je bezpečné, efektivní a levné. Navzdory přetrvávajícím mýtům o kreatinu zůstává kreatin monohydrát jednou z nejrozsáhleji studovaných a účinných pomůcek dostupných pro sportovce. Bylo prokázáno, že účinnost suplementace kreatin monohydrátem vede ke zlepšení anaerobní kapacity, síly a růstu svaloviny.

Jakožto pravidelný uživatel kreatinu monohydrátu mohu říct, že se suplementací budu nadále pokračovat a jsem rád, že jsem se touto formou dozvěděl mnoho nových informací. Určitě tedy doporučuji zařazení kreatinu do jídelníčku všech sportovců.

## 12. Seznam použité literatury

- [1] NEGRO, Massimo, Ilaria AVANZATO a Giuseppe D'ANTONA. Creatine in Skeletal Muscle Physiology. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier, 2019, 59-68
- [2] Kreider, R.B., Kalman, D.S., Antonio, J. 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* 14, 18 (2017)
- [3] Romanchak N., Cupp M.J., Tracy T.S. (2003) Creatine Monohydrate. In: Cupp M.J., Tracy T.S. (eds) *Dietary Supplements. Forensic Science and Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ
- [4] HULTMAN, Eric, Paul L. GREENHAFF, Jian-Ming REN a Karin SÖDERLUND. Energy metabolism and fatigue during intense muscle contraction. *Biochemical Society Transactions* [online]. 1991, 19(2), 347-353. DOI: 10.1042/bst0190347
- [5] GRAHAM, Angie S. a Randy C. HATTON. Creatine: A Review of Efficacy and Safety. *Journal of the American Pharmaceutical Association* (1996) [online]. 1999, 39(6), 803-810 DOI: 10.1016/S1086-5802(15)30371-5.
- [6] Vireo systems, inc.; patent application titled "creatine oral supplementation using creatine hydrochloride salt" published online (USPTO 20170049736). (2017, Mar 17). *Chemicals & Chemistry*
- [7] Terrillon K. *Int J Sports Nutr* 7: 138, 1997 ; Volek JS & WJ Kraemer. *J Strength Cond Res* 10: 200, 1997
- [8] Cooper, R., Naclerio, F., Allgrove, J., & Jimenez, A. (2012). Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 33.
- [9] Jäger, Ralf & Purpura, Martin & Shao, Andrew & Inoue, Toshitada & Kreider, Richard. (2011). Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino acids*. 40. 1369-83. 10.1007/s00726-011-0874-6.
- [10] <https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-the-efficacy%2C-safety%2C-and-regulatory-of-J%C3%A4ger-Purpura/ba125ae71395018871c5e547a25940f51ba60845>
- [11] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Creatine, CID=586, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Creatine>
- [12] Pischel, Ivo & Gastner, Thomas. (2007). Creatine – its Chemical Synthesis, Chemistry, and Legal Status. *Sub-cellular biochemistry*. 46. 291-307. 10.1007/978-1-4020-6486-9\_15.



- [13] Vytvořil autor BP
- [14] Chevreul, M.E., 1834, Creatin, eine neue im Muskelfleisch enthaltene Substanz. *Liebigs Ann. Chem.* 4:293–294
- [15] Elaine B. Feldman, M. D., Creatine: a Dietary Supplement and Ergogenic Aid, *Nutrition Reviews*, Volume 57, Issue 2, February 1999, Pages 45–50
- [16] Liebig, J.v., 1847, Ueber die Bestandtheile der Flüssigkeiten des Fleisches. *Liebigs Ann. Chem.* 62:257–369
- [17] Folin, Otto; Denis, W. (1912). Protein metabolism from the standpoint of blood and tissue analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 12 (1): 141–61.
- [18] Anderson, O. (1993) Creatine propels British athletes to Olympic gold medals: Is creatine the one true ergogenic aid? *Running Research News* 9, 1-5.
- [19] Bird S. P. (2003). Creatine supplementation and exercise performance: a brief review. *Journal of sports science & medicine*, 2(4), 123–132.
- [20] Williams, M.H., Kreider, R.B. and Branch, J.D. (1999) Creatine: The Power Supplement. *Human Kinetics*, Champaign, IL
- [21] Physiological and Health Effects of Oral Creatine Supplementation, *Medicine & Science in Sports & Exercise*: March 2000 - Volume 32 - Issue 3 - p 706-717
- [22] WYSS, Markus a Rima KADDURAH-DAOUK. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* [online]. 2000, 80(3), 1107-1213
- [23] Mesa, J. L., Ruiz, J. R., González-Gross, M. M., Gutiérrez Sáinz, A., & Castillo Garzón, M. J. (2002). Oral creatine supplementation and skeletal muscle metabolism in physical exercise. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 32(14), 903–944.
- [24] Silva, Robin & Clow, Kathy & Brosnan, John & Brosnan, Margaret. (2013). Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. *The British journal of nutrition*. 111. 1-7. 10.1017/S0007114513003012.
- [25] Kreider, R. B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R., Candow, D. G., Kleiner, S. M., Almada, A. L., & Lopez, H. L. (2017). International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14, 18.
- [26] Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the

'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal*, 281 ( Pt 1)(Pt 1), 21–40.

- [27] <https://www.wikiskripta.eu/w/Kreatin>
- [28] D'ANTONA, Giuseppe, Seyed Mohammad NABAVI, Piero MICHELETTI, Arianna DI LORENZO, Roberto AQUILANI, Enzo NISOLI, Mariangela RONDANELLI a Maria DAGLIA. Creatine, L-Carnitine, and  $\omega$  3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation from Healthy to Diseased Skeletal Muscle. *BioMed Research International* [online]. 2014, 2014, 1-16 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1155/2014/613890.
- [29] Wallimann, T., Harris, R. Creatine: a miserable life without it. *Amino Acids* 48, 1739–1750 (2016).
- [30] Kaviani, M., Shaw, K., & Chilibeck, P. D. (2020). Benefits of Creatine Supplementation for Vegetarians Compared to Omnivorous Athletes: A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health*, 17(9), 3041.
- [31] Strecker, A., 1868, In: *Jber. Fortschr. Chem.*, p. 686
- [32] Volhard, J., 1868, In: *Jber. Fortschr. Chem.*, p. 685
- [33] Hartmann, F., and Zieke, K., 1954, Calciumcyanamid. In: Foerst, W. (ed.), *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, Vol. 5, pp. 43–68
- [34] Weiss STEFAH a Krommer HELMUT. Způsob výroby kreatinu a monohydrátu kreatinu. 2002. 290 563. 14.6.2002. 14.8.2002.
- [35] K. KESSEL, G. SCHERR, M. KLUGE, N. BIEDERMANN, T. GREINDL, T. BOGENSTÄTTER a W. HAHNLEIN. Process for the preparation of creatine or creatine monohydrate. Jul. 6, 2004. Denmark. 09/391,384. Sep. 8, 1999. Jul. 6, 2004.
- [36] Kapfhammer, J., and Müller, H., 1934, Guanidinosäuren und Guanidinopeptide. *Z. physiol. Chem.* 225:1–12.
- [37] Kessel, K., and Kluge, M., 1998, Synthesis of guanidines from O-alkylisoureas using a crystal seed. German patent no. 19860048
- [38] GREINDL Thomas, Ginter SCHERR a Klaus MUNDINGER. Preparation of substituted guanidine derivatives. Jul. 25, 2000. Germany. 09/179,093. Oct. 27, 1998. Jul. 25, 2000.
- [39] Wheeler, H.I., and Merriam, H.F., 1903, On the condensation-products of the pseudothioureas: synthesis of uracil, thymine, and similar compounds. *Am. Chem. J.* 29:478–492

- [40] An Lihua, Yuwen Zheng a Guoji Zhang. Process for producing creatine or creatine-monohydrate. Dec. 4, 2001. Tianjin. 09/648,631. Aug. 28, 2000. Dec. 4, 2001
- [41] JOVANOVIĆ, Pavle, Milan VRANEŠ, Marijana SAKAČ, Slobodan GADŽURIĆ, Jovana PANIĆ, Aleksandar MARIĆ a Sergej OSTOJIĆ. Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry as a method for simultaneous determination of guanidinoacetate and creatine. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, 1028, 96-103
- [42] JERÔNIMO, Diego Pereira, Renato Aparecido DE SOUZA, Fabiano Fernandes DA SILVA, Gabriela Loiola CAMARGO, Humberto Lameira MIRANDA, Murilo XAVIER, Kumiko Koibuchi SAKANE a Wellington RIBEIRO. Detection of Creatine in Rat Muscle by FTIR Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2012, 40(9), 2069-2077 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1007/s10439-012-0549-9.
- [43] Schneider, J., Fekete, E., Weisser, A., Neubauer, S. and von Kienlin, M. (2000), Reduced <sup>1</sup>H-NMR visibility of creatine in isolated rat hearts. *Magn. Reson. Med.*, 43: 497-502. doi:10.1002/(SICI)1522-2594(200004)43:4<497::AID-MRM2>3.0.CO;2-M
- [44] FRENZEL, Wolfgang a Ian D. MCKELVIE. Photometry. *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 311-342
- [45] Peake, M., & Whiting, M. (2006). Measurement of serum creatinine--current status and future goals. *The Clinical biochemist. Reviews*, 27(4), 173–184.
- [46] Folin, O., 1904, Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harne. *Z. physiol. Chem.* 41:223–242
- [47] Tanzer, M.L., and Gilvarg, C., 1959, Creatine and creatine kinase measurement. *J. Biol. Chem.* 234: 3201–3204
- [48] Schmidt, R. L., Straseski, J. A., Raphael, K. L., Adams, A. H., & Lehman, C. M. (2015). A Risk Assessment of the Jaffe vs Enzymatic Method for Creatinine Measurement in an Outpatient Population. *PloS one*, 10(11), e0143205.
- [49] Petrova, O. E., & Sauer, K. (2017). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1657, 33–43.
- [50] MacNeil, L., Hill, L., MacDonald, D., Keefe, L., Cormier, J. F., Burke, D. G., & Smith-Palmer, T. (2005). Analysis of creatine, creatinine, creatine-d3 and creatinine-d3 in urine, plasma, and red blood cells by HPLC and GC-MS to follow the fate of ingested creatine-d3. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 827(2), 210–215.

- [51] Dash, A.K., and Sawhney, A., 2002, A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29:939–945
- [52] Kim, H., Seo, C., Kim, Y., Na, M., Kang, J.S., Lee, W. and Paik, M.-J. (2016), Simultaneous Urinary Creatine and Creatinine Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 37: 756-758.
- [53] SMITH, Ian C. P. a Dorothea E. BLANDFORD. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, 67(12), 509-518
- [54] KEELER, James. *Understanding NMR Spectroscopy*. Electronic books. Hoboken: Wiley, 2013
- [55] Michaelis, T., Wick, M., Fujimori, H., Matsumura, A. and Frahm, J. (1999), Proton MRS of oral creatine supplementation in rats. Cerebral metabolite concentrations and ischemic challenge. *NMR Biomed.*, 12: 309-314. doi:10.1002/(SICI)1099-1492(199908)12:5<309::AID-NBM572>3.0.CO;2-Y
- [56] CAPUANO, E. a S.M. VAN RUTH. *Infrared Spectroscopy: Applications*. Encyclopedia of Food and Health [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 424-431
- [57] PRATER, Craig, Kevin KJOLLER a Roshan SHETTY. Nanoscale infrared spectroscopy. *Materials Today* [online]. 2010, 13(11), 56-60 [cit. 2020-07-14].
- [58] MORET, Sabrina, Annalisa PREVARIN a Franco TUBARO. Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. *Food Chemistry* [online]. 2011, 126(3), 1232-1238
- [59] FOŘT, Petr. *Výživa pro dokonalou kondici a zdraví*. Ilustroval Monika WOLFOVÁ. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-1057-9.
- [60] Romanchak N., Cupp M.J., Tracy T.S. (2003) Creatine Monohydrate. In: Cupp M.J., Tracy T.S. (eds) *Dietary Supplements*. Forensic Science and Medicine. Humana Press, Totowa, NJ
- [61] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c3630?lang=en&region=CZ>
- [62] HEZAVE, Ali Zeinolabedini, Sarah AFTAB a Feridun ESMAEILZADEH. Micronization of creatine monohydrate via Rapid Expansion of Supercritical Solution (RESS). *The Journal of Supercritical Fluids* 2010, 55(1), 316-324 ISSN 08968446.
- [63] LEBARON, Tyler W. Creatine Recommendation Report. *Muscle Feast*. 2011, 2011, 30.
- [64] De França, Elias & Avelar, Bruno & Yoshioka, Caroline & Santana, Jeferson & Madureira, Diana & Rocha, Leandro & Zocoler, Cesar & Rossi, Fabrício &

- Lira, Fabio & Rodrigues, Bruno & Caperuto, Erico. (2015). Creatine HCl and Creatine Monohydrate Improve Strength but Only Creatine HCl Induced Changes on Body Composition in Recreational Weightlifters. *Food and Nutrition Sciences*. 06. 10.4236/fns.2015.617167.
- [65] McDonough, Daniel, "Oral Creatine Hydrochloride Supplementation: Acute Effects on Submaximal, Intermittent Bouts of Bench Press and Vertical Jump Exercises" (2017). *Boise State University Theses and Dissertations*. 1348.
- [66] METHYLISOUREA HYDROCHLORIDE. *Organic Syntheses* [online]. 1954,
- [67] Tianjin tiancheng pharmaceutical co., ltd (china); "creatine hydrochloride and manufacturing method thereof" in patent application approval process. (2014, Jul 07). *Pharma Business Week*
- [68] Spillane, M., Schoch, R., Cooke, M., Harvey, T., Greenwood, M., Kreider, R., & Willoughby, D. S. (2009). The effects of creatine ethyl ester supplementation combined with heavy resistance training on body composition, muscle performance, and serum and muscle creatine levels. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 6, 6.
- [69] GUFFORD, Brandon T., Edward L. EZELL, Dennis H. ROBINSON, Donald W. MILLER, Nicholas J. MILLER, Xiaochen GU a Jonathan L. VENNERTSTROM. PH-Dependent Stability of Creatine Ethyl Ester: Relevance to Oral Absorption. *Journal of Dietary Supplements* [online]. 2013, 241-251.
- [70] Jagim, A. R., Oliver, J. M., Sanchez, A., Galvan, E., Fluckey, J., Reichman, S., Talcott, S., Kelly, K., Meininger, C., Rasmussen, C., & Kreider, R. B. (2012). Kre-Alkalyn® supplementation does not promote greater changes in muscle creatine content, body composition, or training adaptations in comparison to creatine monohydrate. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(Suppl 1), P11.
- [71] Jagim, A.R., Oliver, J.M., Sanchez, A. 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* 9, 43 (2012).
- [72] Dalton, R. L., Sowinski, R. J., Grubic, T. J., Collins, P. B., Coletta, A. M., Reyes, A. G., Sanchez, B., Koozehchian, M., Jung, Y. P., Rasmussen, C., Greenwood, M., Murano, P. S., Earnest, C. P., & Kreider, R. B. (2017). Hematological and Hemodynamic Responses to Acute and Short-Term Creatine Nitrate Supplementation. *Nutrients*, 9(12), 1359.
- [73] Joy, J.M., Lowery, R.P., Falcone, P.H. et al. 28 days of creatine nitrate supplementation is apparently safe in healthy individuals. *J Int Soc Sports Nutr* 11, 60

- [74] Jäger, R., Harris, R.C., Purpura, M. et al. Comparison of new forms of creatine in raising plasma creatine levels. *J Int Soc Sports Nutr* 4, 17 (2007).
- [75] Jäger, R., Metzger, J., Lautmann, K., Shushakov, V., Purpura, M., Geiss, K. R., & Maassen, N. (2008). The effects of creatine pyruvate and creatine citrate on performance during high intensity exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 5, 4.
- [76] Tyka, A.K., Chwastowski, M., Cison, T., Palka, T., Tyka, A., Szygula, Z., Pilch, W., Strzala, M., & Cepero, M. (2015). Effect of creatine malate supplementation on physical performance, body composition and selected hormone levels in spinters and long-distance runners, *Acta Physiologica Hungarica Acta Physiologica Hungarica*, 102(1), 114-122.
- [77] Sterkowicz, S., Tyka, A.K., Chwastowski, M. et al. 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* 9, 41 (2012).
- [78] Lahners, C., Pereira, B., Naughton, G., Trousselard, M., Lesarge, F.X., Dutheil, F., 2015. Creatine supplementation on lower limb performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 45, 1285–1294
- [79] Rawson, E. S., & Volek, J. S. (2003). Effects of creatine supplementation and resistance training on muscle strength and weightlifting performance. *Journal of strength and conditioning research*, 17(4), 822–831.
- [80] Earnest, C.P., 1997. Effect of acute creatine monohydrate ingestion on anaerobic capacity. *Kinesiology* 141,
- [81] Earnst, C.P., Almada, A.L., Mitchell, T.L., 1997. Effect of creatine monohydrate ingestion on intermediate length anaerobic treadmill running to exhaustion. *J. Strength Cond. Res.* 4, 234–238
- [82] Bennett, T., Bathalon, G., Armstrong, D.JIII, Martin, B., Cool, R., Beck, R., Barkdull, T., O'Brien, K., Deuster, P.A., 2001. Effects of creatine on performance of militarily relevant tasks and soldier health. *Mil. Med.* 166,
- [83] Branch, J.D., Schwarz, W.D., Van Lunen, B., 2007. Effect of creatine supplementation on cycle ergometer exercise in a hyperthermic environment. *J. Strength Cond. Res.* 21, 57–61
- [84] Oopik, V., Paasuke, P., Timpmann, S., Medijainen, L., Ereline, J., Smirova, T., 1998. Effect of creatine supplementation during rapid body mass reduction on metabolism and isokinetic muscle performance capacity. *Eur. J. Appl. Physiol.* 78, 83–92