

Ultra yüksek seyreltme analizi: Elektron Mikroskobu, Raman Spektroskopisi ve Derin Öğrenme ile potenzasyon etkilerinin araştırılması

Camelia Berghian-Grosan^a, Sahin Isik^b, Alin Sebastian Porav^a, Ilknur Dag^{c,d}, Kursad Osman Ay^c, George Vithoukas^e

a National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies, Cluj-Napoca 400293, Romania

b Computer Engineering Department, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turkey

c Central Research Laboratory Application and Research Center, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turkey

d Vocational Health Services High School, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turkey

e University of the Aegean, Mytilene 81100, Greece

E-mail adresleri: camelia.grosan@itim-cj.ro (C. Berghian-Grosan), george@vithoukas.com (G. Vithoukas).

Yazı : 22 January 2024 ulaştı; 17 March 2024 düzeltildi; 20 March 2024 kabul edildi

21 March 2024 online yayınlandı

0167-7322/© 2024 Yazarlar

Elsevier B.V. tarafından yayımlanmıştır. Bu, CC BY-NC lisansı kapsamında açık erişimli bir makaledir

(<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>)

Anahtar Kelimeler: Aurum metalikum, Ultra yüksek seyreltmeler, Potenzasyon, Küme düzenekleri, Yapay zeka, Raman verileri

Öz

Aşırı yüksek seyreltiler konusu yıllar boyunca sürekli olarak tartışılmış bir konudur, çünkü esas olarak bu tür seyreltilmiş çözeltileri analiz edebilmek imkanları sınırlıdır. Bu bağlamda, etanol ve su bazlı yüksek oranda seyreltilmiş altın çözeltileri, her tip için üç potenzasyon seviyesinde (6C, 30C ve 200C) morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelendi. Ayrıca arıtılmış su, arıtılmamış su ve arıtılmış su bazlı altın çözeltilerinden oluşan üç potenzasyon seviyesinin analizi için Raman spektroskopisi ve derin öğrenme (DL) algoritmaları kullanıldı. Üç grup da dikkate alınan her kategori için değerlendirildi, araştırılan tüm kategoriler arasında her grup içindeki potensler veya aynı potens seviyesindeki sınıflar arasında ayırım yapma yeteneği TEM bulgularıyla ilişkilendirilerek sunuldu ve tartışıldı. TEM tarafından, üç potens seviyesi için farklı örgütlenme biçimleri ortaya çıkarıldı, geçitli tekrarlayan birim (GRU) modeli tüm sınıfları ayırt etmekte büyük doğruluk gösterdi (%88), her grup içindeki örnekleri ayırt etmek için %90'ın üzerinde doğruluk ve ön işleme tabi tutulmamış Raman spektrumları kullanılırsa, aynı potenzasyon seviyesinde sınıflandırma için %95'in üzerinde doğruluk görüldü. Sonuç olarak, bu yöntem paketi (DL ile kombinasyon halinde TEM-EDX ve Raman spektroskopisi) potenzasyondan sonra ortaya çıkan yüksek derecede seyreltilmiş çözeltilerin tanımlanması ve farklarının tespiti için başarılı bir şekilde kullanılabilir. Ayrıca 11 sınıfın tamamını kapsayan tespit çalışmasından elde edilen sonuçlar dikkate alındığında ve bir veri artırma yaklaşımı olan spektral bölümlenme yöntemi, model tahmin doğruluğunu arttırmak için değerli bir strateji olarak görülebilir.

1. Giriş

Potentizasyon ardışık dilüsyonları ve şiddetli çalkalam içeren bir süreçtir; ilk kez Almanlar tarafından tanıtılmıştır. Maddelerin çözeltilerini gözlemleyen Dr. Samuel Hahnemann, bu süreçten geçen maddelerin insanlar üzerinde iyileştirici bir etkisi olduğunu gözlemlemiştir [1]. Bugüne kadar çok çeşitli maddelerden iyileştirici özelliklerini elde etmek için potentizasyon yolu ile elde edilen çok sayıda homeopatik remediler kullanılmış ve bunlar çok iyi belgelenmiştir [2–6]. Pekçok bakış açısı ile Homeopatik ilaçların etkisini açıklanmaya çalışılmıştır [7–11]. Şiddetli çalkalama işleminin etkileri Ekinazyia 10^{-2} , Baptisia 10^{-3} , Baptisia 10^{-4} , Luffa 10^{-4} ve Spongia 10^{-6} gibi remediler üzerinde daha önce incelenmiş ve yakın zamanda damlacık buharlaşması ve istatistiksel analiz yardım yoluyla vurgulanmıştır; numuneler üretildi Avrupa Farmakopesi kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve yazarlar 0, 10 veya 100 çalkalama uygulamışlardır. Sonuçlar incelenen tüm preparatlar için önemli farklılıklar göstermiştir [12]. Ayrıca mekanik şokların (çalkalama, düşürme) protein çözeltileri üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir ve bu etkilerin azaltılması için bazı araştırmalarda önlemler önerilmiştir [13,14]. Ancak homeopatik ilaç hazırlama sırasında çalkalama ile seyreltme birlikte yapılması gerekir.

Yüksek seyreltmelerde potentize edilmiş çözeltilerle ilgili büyük bir endişe de orijinal maddenin bulunamayacağı sınır olan (12C), Avogadro sayısının ötesinde (30C, 200C, vb.) seyreltilen çözeltilerde başlangıç malzemesinden en ufak bir miktar bile bulunmasının beklenmemesidir [15]. Bununla birlikte, bu şekilde elde edilen ilaçlara dayanan bir çalışmada, Chikramane ve arkadaşları [10] 30C ve 200C potensinde aşırı seyreltmelerde transmisyon elektron mikroskobu (TEM), elektron kırınımı ve indüktif olarak eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektroskopisi (ICP-AES) ile nanopartikül formunda bulunan metaller ile başlangıç maddesinin varlığını gösterdiler. Homeopatik olarak hazırlanmış ilaçların karakterinin belirlenebilmesi ve yüksek oranda seyreltilmiş ilaçlarda spesifik yapıların varlığının tespiti için yıllar boyunca çeşitli teknikler kullanılmıştır [16–24]. Ancak bilim camiasında iyi bilinmektedir ki Benveniste deneyinin [25] yayınlanmasından kısa bir süre sonra “Suyun hafızası üzerine tartışma” başlıklı makalesinde [26] George Vithoulkas'ın açıkladığı gibi bulguların gerçeği yansıtmadığı “Nature” dergisi tarafından yazarın laboratuvarına gönderilen bir bilim komitesi tarafından da kanıtlanmıştı.

Su, biyolojik olaylarda ve kimyasal süreçlerde önemli rol oynayan özel bir çözücüdür [27]. Bu nedenle suyun özelliklerini anlamak sürekli olarak ilgi konusu olmuş ve bu özel sıvının yapısını anlamak için pek çok deneysel ve teorik çalışmalar yapılmıştır [28,29]. Ancak yapısı ve dinamikleri açısından su konusu halen sürekli olarak tartışılmaktadır [30]. OH'nin farklı ortamlara duyarlı değişim özelliği suyun yapısı ve dinamiğinin incelenmesinde titreşim spektroskopisi kullanılmasına izin verir [28].

Suyun kızılötesi ve Raman spektroskopisi ile incelenmesi OH gerilme bölgesinde yaygın zirveler ortaya çıkarırken (çeşitli tür birçok temel katkı farklı yerel hidrojen bağı düzenlemeleri tarafından indüklenirken), buz spektrumunda net tepe noktaları açıkça görülebilmektedir [31].

2009 yılında Sun [32] Raman spektroskopisi ile ortam koşulları altında sıvı suyu analiz etti ve OH germe bölgesinin beş alt banda ayrıldığı ters evrişimini önerdi. Ancak suyun karmaşıklığı

nedeniyle araştırılan çözeltilerin yüksek seyreltileri nedeniyle bu tür analizler çok zor görev. Bu zorlukların üstesinden gelmek için kemometrik teknikler ve daha yakın zamanlarda ise analiz ve veri öğrenimi için Raman sinyallerine makine öğrenimi (ML) modelleri uygulandı [33].

ML algoritmaları şu anda sınıflandırmada giderek artan bir popülerlik kazanan uygulamalardır [34,35]. Son zamanlarda geleneksel ve derin öğrenme algoritma yöntemleri çeşitli karmaşık malzemelerin (örneğin minerallerin) Raman spektrumları veya yüksek boyutlu spektroskopik veriler sınıflandırılmasında başarıyla uygulanmıştır [36-38].

Derin öğrenme (DL), ML'nin önemli ölçüde kapsamlı bir alt alanıdır, geçmişte kullanılan mühendislik tabanlı yöntemlerden daha sağlamdır. DL yaklaşımlarının zaman tasarrufu da dahil olmak üzere birçok faydası vardır, hiçbir özellik yapısı gerektirmez ve üstün sonuçlar verir. Genel olarak YSA (ANN) olarak bilinen yapay sinir ağları, (DL) derin öğrenme tekniklerinin öncüleridir. YSA'lar bir giriş katmanı ve bir veya daha fazla orta seviye katmanı ve bir çıktı katmanından oluşur. Bu yaklaşımlar genellikle denetimli eğitimlerdir, bu da eğitim sürecinde bir amaç için önceden tanımlanmış etiketlerin kullanıldığı veri seti anlamına gelir. Evrişimli sinir ağı (CNN convolutional neural network) [39], DL ağlarını en iyi temsil eden, ileri derecede geri beslemeli evrişimsel işlemler ve çok sayıda filtre kullanan bir sinir ağı bir türüdür. İstenen göreve uygun olarak kullanılacak evrişim tabanlı birçok farklı öğrenme algoritma türü vardır. Görüntü odaklı uygulamalar için genellikle 2 boyutlu CNN modelleri kullanılır. Geçitli tekrarlayan ünite (GRU gated recurrent unit) [40,41] ve 1-D CNN modelleri, zaman serisine dayalı tahminleri işlemek veya sınıflandırma işlemleri için kullanılır. Tercih edilmeleri için temel motivasyon, yinelenen modellerin, uzun süreli ilişkilerde sekans arası verileri koruma potansiyeline sahip olmasıdır. Bu yaklaşımlar kaybolan gradyan probleminin çözülmesi konusunda önemli yardım sağlar [42].

Bu çalışma, Homeopatik bir ilaç olan Aurum metalikum (AUR)'un potente edilmiş etanol ve su bazlı altın çözeltilerinin yapısal kompozisyonunu araştırmaktadır.

Üç yüksek oranda seyreltilmiş (6C, 30C ve 200C) AUR çözeltileri Romanya ve Türkiye'de bulunan iki bağımsız laboratuvar tarafından TEM analizine tabi tutuldu. Bu çözeltilerin farklı kompozisyonları her iki laboratuvar tarafından doğrulandı. Bu yüzlük seyreltmelerin seçimi, Avogadro sayısının ötesinde seyreltilmiş olsa bile (örneğin son 2 seyreltme), düşük miktarlarda başlangıç maddesi içeren çözeltilerin araştırılması ihtiyacından kaynaklanmıştır.

Çeşitli güçlendirilmiş su bazlı solüsyonlarda (saflaştırılmış su (PW), saflaştırılmamış su (UW) ve PW bazlı altın solüsyonu (AUR)) için Raman spektrumları elde edildi ve GRU modellerinin bu solüsyonlar arasında ayırma yeteneğini araştırmak ve araştırılan kategoriler (AUR, PW ve UW) ile üç potensiyon seviyesindeki (6C, 30C ve 200C) örnekleri sınıflandırmak için DL algoritmaları tarafından işlendi. Raman spektral değerleri zaman serisi olduğu varsayılır; dolayısıyla tekrarlayan bir sinir ağı uyguladık. Hem kaybolan gradyan problemini hem de hız sorununu çözdüğü için GRU modeliyle deneyler yaptık. Potensiyondan sonra elde edilen su bazlı çözeltilerin analizi için kullanılacak olan sınıflandırma yaklaşımının kapasitesini Raman spektroskopisi ile birlikte test ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar bu yöntem paketinin (DL ile birlikte TEM-EDX ve Raman spektroskopisi) potensiyon işleminden sonra ortaya çıkan yüksek

oranda seyreltilmiş çözeltilerin tanımlanması ve ayırt edilmesi için başarıyla kullanılabilir olduğunu kanıtlamamıza olanak sağladı.

2. Materyel ve metodlar

2.1. Materyeller

İncelenen tüm solüsyonlar, Yunanistan Ulusal İlaç Kurumu (EOF - Greece) tarafından sertifikalı bir şirket olan Korres (Atina, Yunanistan) tarafından hazırlandı. Bu solüsyonlar, Alman Homeopatik Farmakopesi'ne (GHP) uygun olarak, İyi Üretim Uygulamaları (GMP) yönergelerine bağlı kalınarak [43] ve Avrupa standartlarına uygun olarak üretildi; açıkça belirtilen birkaç istisna dışında uygunluk testleri için Farmakope prosedürleri dikkate alınır. Spesifik olarak istisnalar, hazırlama prosesinin son adımında kullanılan solventlerle ilgilidir: etanol bazlı solüsyonlar için %50 v/v etanol ve su bazlı solüsyonlar için arıtılmış su'dur. Solüsyonlar başlangıç malzemesine göre kategorize edildi ve üç gruba ayrıldı : arıtılmış su (PW), arıtılmamış su (UW) ve Aurum metalikum (AUR). Her kategori için üç etki düzeyi (6C, 30°C ve 200°C) her etki seviyesinden üç parti olarak farklı günlerde hazırlandı. C işareti yüzdelik seyreltme ile ilişkilidir ve 99 pay eluent (kütle/kütle) için 1 pay konsantre çözelti/önceden güçlendirilmiş çözelti anlamına gelir.

PW ve UW örneklerinin hazırlanmasındaki amaç, içinde aktif bir tıbbi bileşenin bulunmaması dışında her bakımdan tıbbi çözümlere benzeyen potente edilmiş solüsyonlar hazırlamaktır. PW (Avrupa Farmakopesi'ne uygunluk – Ph. Eur.) genellikle homeopatik ilaçların hazırlanmasında kullanılır, UW ise kısmen saflaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan su türleri, Korres şirketinin belirttiği gibi aşağıdaki özelliklere sahiptir: PW – iletkenlik 0.7–0.88 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 6.4–6.8, NO_3^- <0.2 ppm, ve metal iyonlar, Al < 3–5 ppb, As < 0.005 ppm, Pb 0.00032 ppm, Cd < 0.001 ppm, Hg < 0.0005 ppm (toplam ağır metaller 0.00682 ppm, limit < 0.1 ppm); UW - iletkenlik 196 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7.8, HCO_3^- 66 ppm, Cl^- 22 ppm, NO_3^- 9.8 ppm, Na^+ 15 ppm, Ca^{2+} 10 ppm, Mg^{2+} 8.8 ppm, CO_2 9.7 ppm. Böylece, başlangıç malzemesi olarak sırasıyla Ph.Eur. arıtılmış su ve arıtılmamış su kullanıldı. Ph.Eur. arıtılmış su seyreltme işleminde ve özel deneysel amaçlar nedeniyle 30C ve 200C PW ve UW çözeltilerinin hazırlanması süreçlerinde de kullanıldı.

AUR kategorisi için, Aurum metalikum'un taşıyıcı element olan laktoz monohidrat ile toz haline getirilmesine dayanan yöntem ilk olarak 4C seviyesinde gerçekleştirildi; daha sonra 6C potensli likidi elde etmek adına, 5C potensinin ve %30 etanolün (m/m) hazırlanması için protokol (Ph.Eur'a göre uygunlukta) arıtılmış su kullandı ve 6C potensinde seyreltilmiş sıvı üretildi. 6C'den başlayarak 29C'ye ve buna bağlı olarak C199'a kadar hazırlama işleminde Ph. Eur. arıtılmış su kullanıldı. 30C ve 200C'nin nihai güçlendirilmiş çözeltileri, etanol bazlı AUR çözeltileri için %50 (h/h) etanol ile üretildi. Özel deneysel amaçlar nedeniyle, 30C ve 200C su bazlı AUR solüsyonlarının hazırlanması süreçlerinde Ph. Eur. arıtılmış su kullanıldı.

2.1.1. Transmisyon elektron mikroskobu

TEM çalışmaları için iki tip AUR örneği dahil edildi; % 50 v/v etanol çözeltisinde hazırlanan birinci tip AUR, Romanya'da analiz edildi ve E-AUR olarak adlandırıldı; ikinci tip AUR ise sadece

saf suda (PW) hazırlandı ve Türkiye'de analize tabi tutuldu (W-AUR olarak not edildi). Her iki AUR türü için, 6C, 30C ve 200C olmak üzere üç potente numune araştırıldı.

2.1.2. Raman araştırmaları

Raman araştırmaları için üç tip çözelti kullanıldı: arıtılmış su (PW), arıtılmamış su (UW) ve AUR. Ek olarak, PW ve UW grupları için potente edilmemiş numuneleri (potentizasyon işlemi için kullanılan su türlerinin referans örnekleri) ve üç tip potente edilmiş su numunesini (6C, 30C ve 200C) dikkate aldık; her tür güçlendirilmiş su numunesi için üç farklı günde üç parti hazırlandı. AUR kategorisi için yalnızca su bazlı güçlendirilmiş solüsyonlar araştırıldı. Bu, PW için toplam 12 numune, UW için 12 numune ve AUR için 9 numune dikkate alındığı anlamına gelir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Romanya TEM ve EDX prosedürleri

AUR örneklerinin yapısal ve morfolojik tanımlaması, ikincil elektron (SE) detektörü, iletilen elektron (TE) detektörü (Hitachi High Tech., Japonya) ve 0,144 nm çözünürlüğe sahip yüksek çözünürlük görüntüleme (HRTEM) için tasarlanmış bir soğuk alan emisyon tabancasıyla donatılmış Hitachi HD-2700 taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) üzerinde gerçekleştirildi. Karbon kaplı TEM ızgaraları, daha önce homojenizasyon için 10 kez başarılı olan 6 ul güçlendirilmiş AUR solüsyonu ile işlendi. 1-2 dakika sonra fazla sıvı Whatman derece 1 filtre kağıdıyla kurutuldu ve ızgaraların havada kurummasına izin verildi. Numuneler 200 kV'da çalıştırılan STEM sistemi kullanılarak analiz edildi. EDX araştırmaları için X-Max N100TLE silikon sürüklenme dedektöründen (SDD) (Oxford Instruments) oluşan ikili bir EDX sistemi kullanıldı.

2.2.2. Türkiye TEM ve EDX prosedürleri

AUR'un üç potensine (6C, 30C ve 200C) ait TEM görüntüleri 100 kV voltajlı ivmeyle çalışan Hitachi HT 7800 TEM kullanılarak elde edilmiştir. Her numune 10 kez çalkalandıktan sonra karbon kaplı ızgaraya 1 damla damlatıldı ve temiz bir ortamda kurumaya bırakıldı. Numunelerin EDX analizi, altının varlığını doğrulamak için aynı TEM cihazına bağlı bir Oxford Instruments X-MaxN kullanılarak gerçekleştirildi. Hem Romanya hem de Türk TEM görüntüleri için hazırlanan histogramlar ImageJ yazılımı (NIH, ABD) ile elde edilen verilere dayanılarak gerçekleştirildi.

2.2.3. Raman spektroskopisi

Raman spektrumları, 514,5 nm lazer (yeşil işik) uyarımı kullanan yük bağlantılı cihaz (CCD) detektörü ile donatılmış bir NRS-3300 Raman spektrometresine (Jasco, Japonya) kaydedildi. Çözeltiler, çapı 1,5-1,6 mm olan cam kılcal tüplerde (Marienfeld, Almanya) analiz edildi. Bir Olympus UMPLFL 20X objektif, 600 l/mm ızgara, 0,1 x 6 mm yarık, 120 saniyelik pozlama süresi ve üç tarama, yaklaşık 72 cm⁻¹'den 4020 cm⁻¹'e kadar Raman spektrumlarını kaydetmek için kullanıldı. Spektrometreyi kalibre etmek için Si'ye karşılık gelen tepe kullanıldı. Ham ve gürültülü verilerde gürültü giderilmedi veya düzeltilmedi ve aykırı değerler veri kümesinden kaldırılmadı. Verilerin ön işlenmesi iki ana adımı içeriyordu ve Spectra Manager (JASCO) ve OriginPro 2023 (OriginLab Corporation) ile gerçekleştirildi. İlk veri ön işleme adımı, 180 ile 4000 cm⁻¹ arasında bir dalga sayısı aralığı seçmiş ve 0,3 veri aralığına sahip 3. dereceden bir spline yöntemi uygulayarak özellik sayısını 13.000'in altında sınırlandırmıştır. Bu veriler ayrıca [0,1]'e

normalleştirildi ve ön işleme tabi tutulmamış Raman verileri olarak DL araştırması için kabul edildi. İkinci adım, normalleştirmeden önce birinci adımdan elde edilen verilere OriginPro'da uygulanan bir temel çıkarma (bg) işlemini içeriyordu. BG sürecini uygulamak için şu adımlar gerçekleştirildi: kullanıcı tanımlı taban çizgisi modu, bağlantı noktası tespiti için 2. türev (sıfır) yöntemi, spektruma yakalama, çizgi enterpolasyonu yöntemi ve giriş verileriyle aynı sayıda taban çizgisi noktası [44]. Elde edilen veriler, DL çalışması için bg ile ön işleme tabi tutulmuş veri kümelerinin oluşturulmasında kullanılmadan önce ayrıca [0,1]'e normalleştirildi.

2.2.4. Derin öğrenme

DL araştırmaları Python programlama dili ve hızlandırılmış bilgi işlem ortamı sağlayan Colab Pro kullanılarak gerçekleştirildi. GRU modeli Keras 2.12.0 kütüphanesi ile eğitildi ve oluşturuldu. Modeli eğitmek için büyük parti boyutuna sahip Colab Tesla T4 GPU kullanıldı. Tesla T4'te toplam 2560 CUDA çekirdeğinin yanı sıra 3,7 hesaplama, 15 GB bellek ve GDDR6 VRAM bulunuyor. Ayrıca elde edilen bulguların analiz edilmesi ve açıklanması amacıyla Sklearn 1.2.2 paketinden yararlanılmıştır. DL araştırmalarına yönelik protokole ilişkin daha fazla ayrıntı Ek Malzeme dosyasında ve Şekil S1 ve S2'de sunulmaktadır.

3. Sonuçlar

Önerdiğimiz yöntemin çeşitli çözeltilerin ve potenslerin tanımlanmasına yönelik becerisini tespit edebilmek için öncelikle numunelerin özelliklerinin TEM analizi ile belirlenmesini amaçladık.

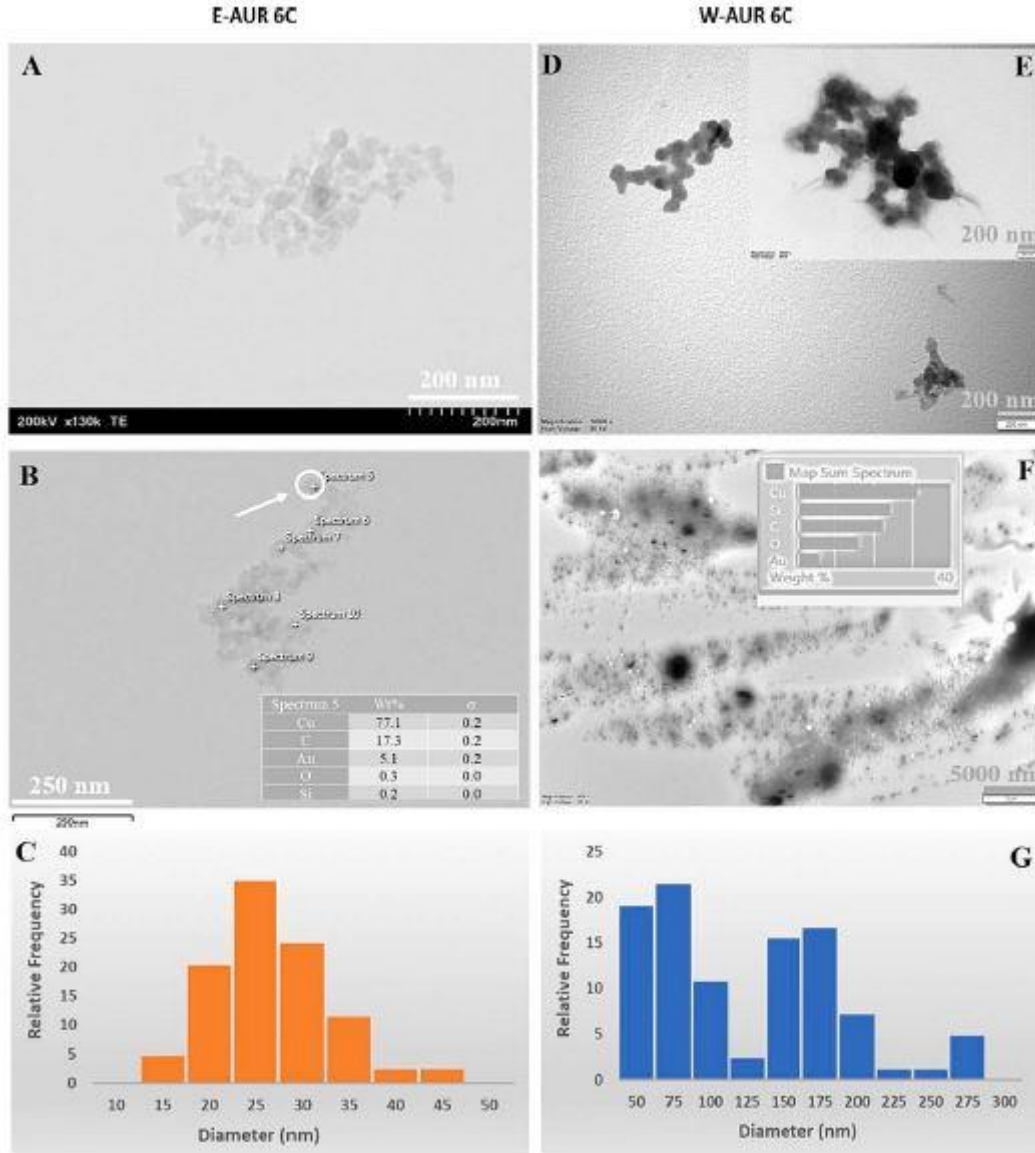
3.1. TEM araştırması

TEM, nanomateryellerin kompozisyonu ile ilgili temel veriler sağlayan değerli bir araçtır; bu bilgi, malzeme bilimini ve nano yapıardan oluşan yüksek oranda seyreltilmiş çözeltilerin kullanıldığı alanları anlamak ve gelişmesini sağlamak açısından bizim için çok önemlidir.

3.1.1. Aurum metalikum 6C

Şekil 1, AUR'nin 6C potensi için iki farklı cihazla (Yöntemler bölümüne bakınız) elde edilen birkaç TEM görüntüsünü sunmaktadır. Numune hazırlamak için iki farklı ortam kullanıldı - ilk ortam, Romanya'da analiz edilen AUR numuneleri (E-AUR 6C) için kullanılan %50 v/v etanol çözeltisiydi. İkinci ortam ise Türkiye'de incelenen örneklerde kullanılan saf sudur (W-AUR 6C).

Çözücülerdeki temel farklılıklara rağmen elde edilen TEM nanopartiküllerin şekli açısından görüntüler oldukça benzerdir. Ancak nanopartikül boyutu solvent tipine bağlıdır. Bu, iki numunenin histogramlarında ortaya çıkar ve E-AUR 6C için W-AUR 6C'ye göre daha küçük nanoparçacıkları gösterir (Şekil 1C ve G), bunun nedeni büyük ihtimalle etanolün stabilize edici bir madde olarak sudan daha etkili olmasıdır. EDX verileri (Şekil 1 ve Şekil S3 ve S4'ün ekleri), her iki örnekte de karşılaştırılabilir altın (Au) yüzdelerini ile silikon (Si) ve oksijenin (O) (bakır (Cu) izgaradandır) varlığını göstermektedir.



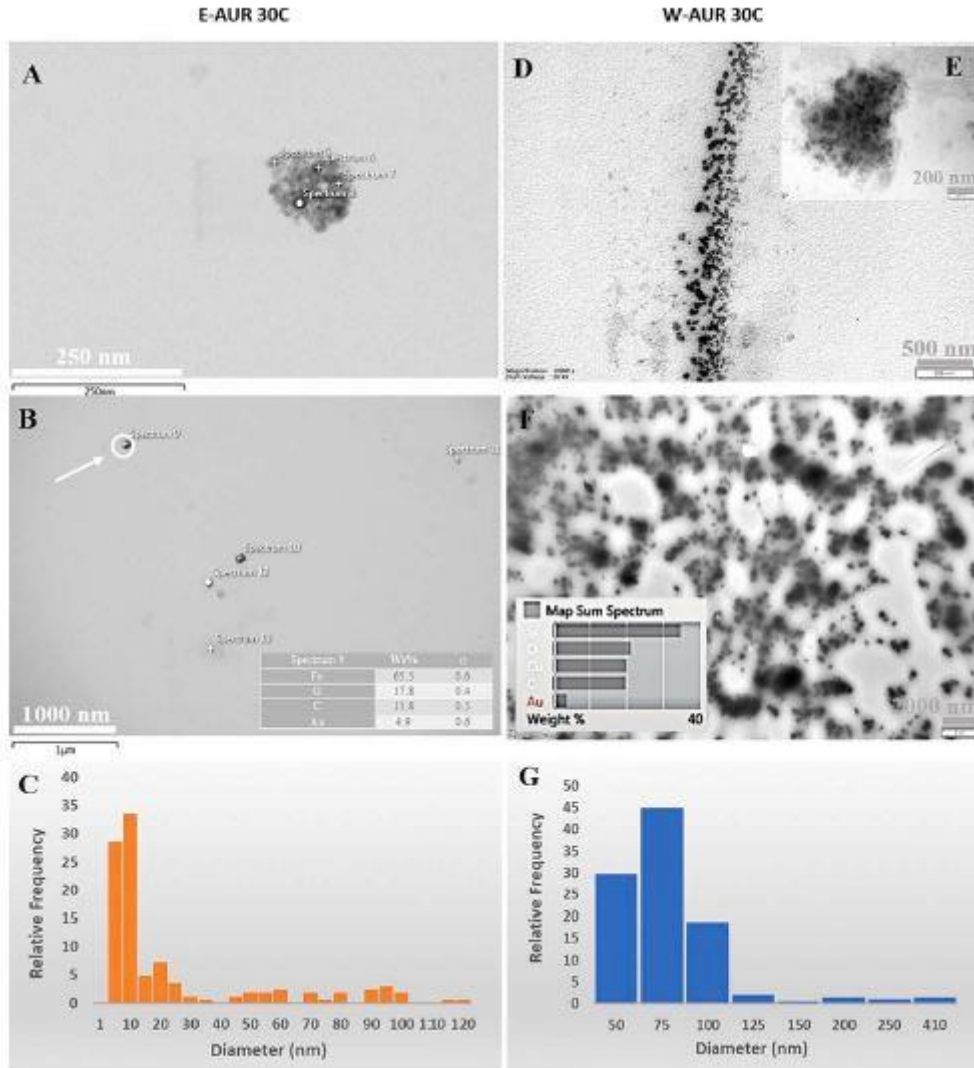
Şekil 1 - AUR'un 6C potensi için TEM verileri. AUR etanol bazlı numuneler için nanopartikül boyutlarının göreceli sıklığının (A-C) TEM görüntüleri ve Histogramı ve su bazlı numuneler için (D-G); ek - işaretli noktalar veya toplam spektrum için EDX verileri.

3.1.2. Aurum metalikum 30C

Ayrıca AUR'un 30C potansiyeli araştırıldı; Şekil 2 ve Şekiller. S5-S8 bu potense ilişkin TEM görüntülerini, EDX verilerini ve TEM-EDX haritalama sonuçlarını göstermektedir. Burada, nano yapı şekli ve safsızlıkların görünümü açısından E-AUR 30C ve W-AUR 30C olmak üzere iki örnek arasındaki benzerlikler üzerinde durmaya değerdir.

Önceki durumda olduğu gibi, 6C potensi, 30C potensinin nanopartiküllerinin/nanoyapılarının boyutu, E-AUR için W-AUR'dan daha küçük olma eğilimindedir (Şekil 2C ve G); bu davranış, etanolün etkili bir stabilizasyon maddesi olarak hareket etme kapasitesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca, Şekil 2'deki histogramlar. Şekil 1 ve 2, E-AUR 30C'de E-AUR 6C'den daha küçük nanoyapıları ve su bazlı numunelere göre boyutta 150 nm'den fazla önemli bir azalmayı gösterir; bu büyük yapılar W-AUR 6C'de açıkça görülüyor, ancak W-AUR 30C örneğinde yalnızca

izler halinde görülebiliyor. İki potensin (6C ve 30C) profilleri arasındaki bu önemli değişiklik, birkaç ardışık seyreltme ve çalkalama içeren potenzasyon işleminden sonra ortaya çıkar.



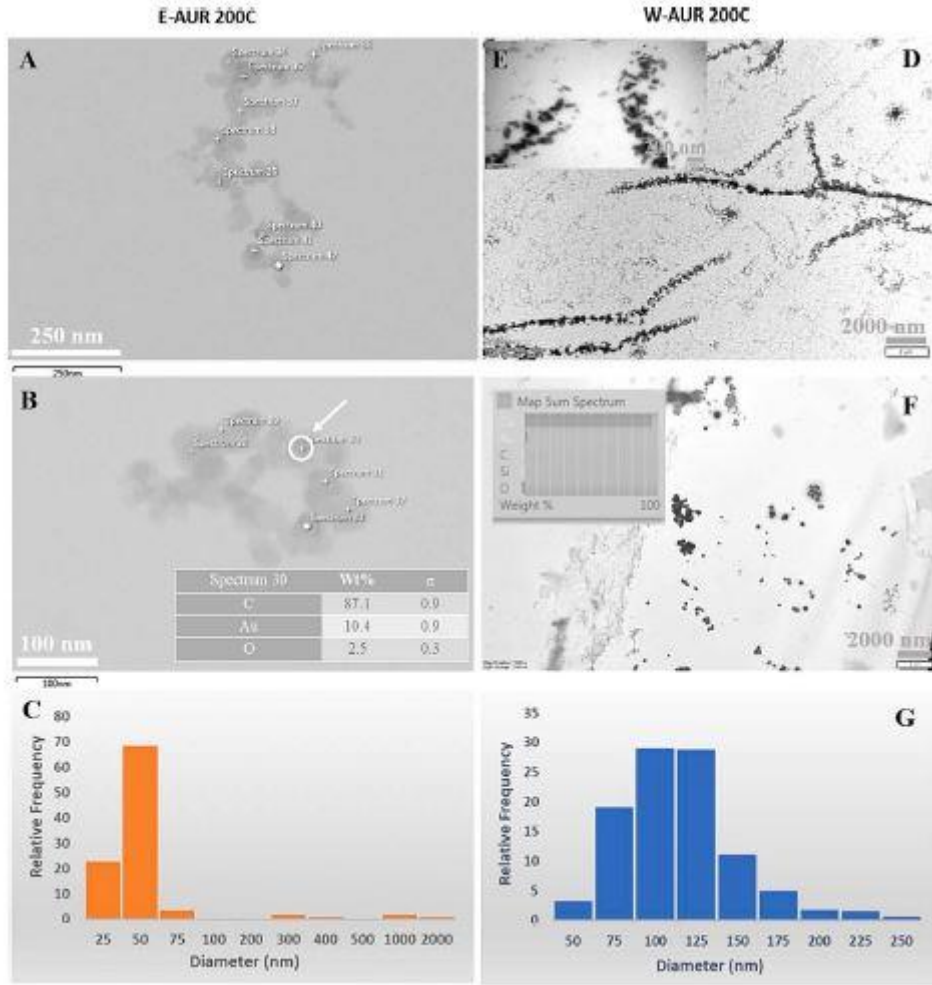
Şekil 2 - AUR'un 30C potensi için TEM verileri. (A-C) TEM görüntüleri ve AUR etanol bazlı numuneler için nanopartikül boyutlarının göreceli sıklığının histogramı ve su bazlı numuneler için (D-G); ek - işaretli noktalar veya toplam spektrum için EDX verileri.

3.1.3. Aurum metalikum 200C

200C potensinin özellikleri Şekil 3 ve Şekil S9-S11 de gösterilmektedir ve iki numune analiz edilerek elde edilmiştir (E-AUR 200C – sulu %50 v/v etanol çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır ve W-AUR 200C – yalnızca saf su ile elde edilmiştir). 6C ve 30C potensleri için gözlemlenen genel eğilim burada da mevcuttur; daha kesin olarak, Şekil 3'teki histogramlarda da görüldüğü gibi, E-AUR 200C örneğindeki nanoyapıların boyutu W-AUR 200C'dekilerden daha küçüktür. Ayrıca, her iki 200C numunesi için de nanopartiküller, 30C potansında gözlemlenen nanopartiküllerden daha büyüktür ve boyut ve şekil olarak 6C potensindeki nanopartiküllerden çok farklıdır (Şekil 1-3).

Bazı AUR'larda farklı kompozisyon ve safsızlıkların tamamen yokluğu 200C küme düzenekleri Şekil 3B'de açıkça görülmektedir. Ayrıca, her iki AUR 200C numunesi de dallanmış birleşim

modu sergilemektedir (Şekil 3A ve D) ve bu kümelerde Si ve Fe gibi küçük miktarlarda yabancı maddelerin varlığı, Şekil 3'ün ekinde sunulan EDX verileri Şekil S9 ve S11B de sunulmuştur.



Şekil 3 - AUR'un 200C potensi için TEM verileri. (A-C) TEM görüntüleri ve etanol bazlı numuneler için nanopartikül boyutlarının göreceli sıklığının histogramı ve su bazlı numuneler için (DG); ek – işaretli noktalar veya toplam spektrum için EDX verileri.

3.2. Raman spektroskopisi ve derin öğrenme araştırmaları

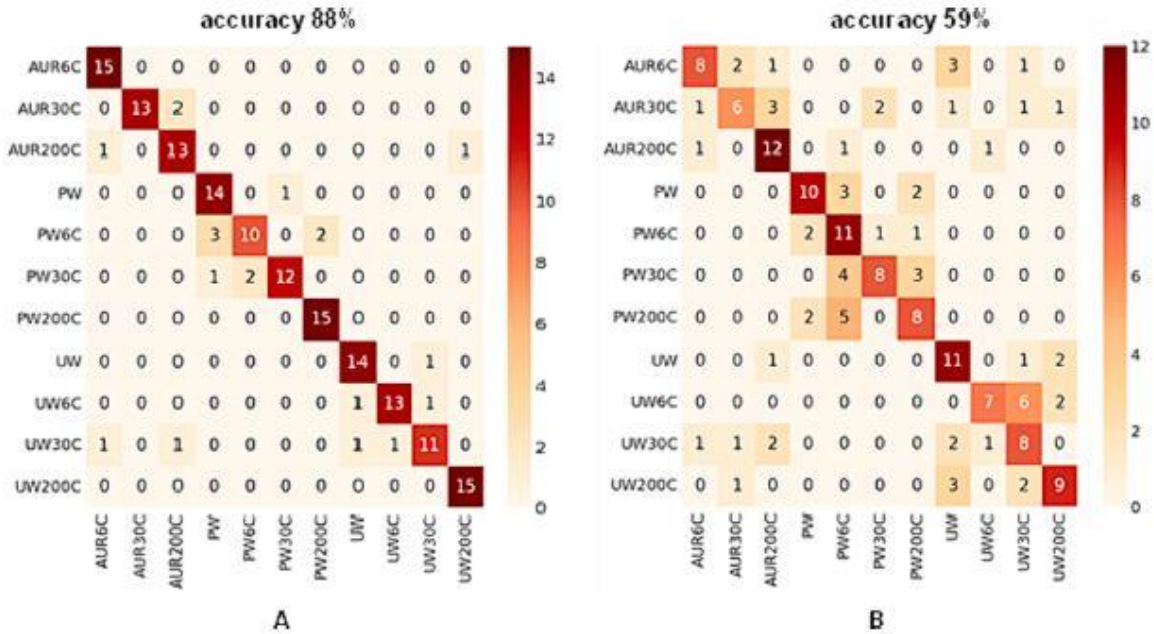
TEM çalışmaları yapıldıktan sonra incelenen çözümlerin analizi için Raman spektroskopisi gibi hızlı ve tahribatsız bir teknik düşünülebilir. Su bazlı numuneler için TEM'de gözlemlenen daha büyük düzenekler nedeniyle ve su-etanol çözeltilerinin Raman özellikleri dikkate alındığında, Raman spektroskopisi yalnızca su bazlı çözeltilere uygulandı. Amaç üç grupta/kategoride ortaya çıkan dönüşümleri araştırmaktır: PW, UW ve AUR. PW genellikle homeopatik ilaç hazırlamak için kullanılırken, UW kısmen saflaştırılmış bir su formudur; bu su türleri farklı özelliklere sahiptir. Burada, PW numunelerinin düşük iletkenliğine (0,7–0,88 $\mu\text{S}/\text{cm}$) ve düşük iyon seviyelerine ($\text{NO}_3^- < 0,2$ ppm, $\text{Al} < 3-5$ ppb, toplam ağır metaller 0,00682 ppm) dikkat çekiyoruz; üstelik UW numuneleri daha yüksek iletkenliğe (196 $\mu\text{S}/\text{cm}$) ve ayrıca daha yüksek farklı iyon konsantrasyonlarına (nitrat, bikarbonat, sodyum vb.) sahiptir. Daha fazla ayrıntı için Malzeme ve Yöntemler bölümüne bakınız.

Hazırlanan PW, UW ve AUR örneklerine potansiyasyon uygulandı.

6C, 30C ve 200C potanslarında üç grup güçlendirilmiş numune elde etmek için üç farklı gün. PW ve UW genellikle ticarileştirilme potansiyeline sahip değildir; potentizasyon işlemi onlara sadece bu çalışma için uygulandı. Böylece 33 numune Raman spektroskopisi ile analiz edildi. Araştırılan çözümlerin temsili verilerini elde etmek için her numune 5 noktada analiz edildi. Toplam 165 Raman spektrumu (180–4000 cm^{-1} aralığı) sınıflandırma çalışmasına tabi tutuldu. Araştırılan numune türlerinin (PW, UW ve AUR) farklı potentizasyon seviyeleri (6C, 30C ve 200C) için bu deney sırasında elde edilen ham ve bg ile ön işleme tabi tutulmuş Raman spektrumları, Şekil S12-S17'de gösterilmektedir.

3.2.1. GRU modeli kullanılarak tüm sınıfları derin öğrenmeyle sınıflandırma

Eğitilmiş GRU modeli kullanılarak elde edilen 11 farklı sınıf için Raman spektral sınıflandırma sonuçları Şekil 4'te gösterilmektedir; hem ön işleme tabi tutulmamış hem de bg ile ön işleme tabi tutulmuş veri kümeleri dikkate alınmıştır.



Şekil 4 - Araştırılan tüm kategorilerin (A) ön işleme tabi tutulmamış ve (B) bg ile ön işleme tabi tutulmuş verileri için GRU modelinin karışıklık matrisi.

Karışıklık matrisi, GRU modelinin sonucu doğru veya hatalı tahmin ettiği durumların sayısının bir özetini sağlamak için görüntülenir. Model, incelenen üç kategoriye karşılaştırırken çok iyi bir tanıma kapasitesi sergiliyor; dolayısıyla ön işleme tabi tutulmamış Raman verileri dikkate alındığında AUR, PW ve UW kategorileri arasında ayırım yapmakta büyük doğruluk gözlemlenmektedir (Şekil 4A). Bu durumda %88'lik bir doğruluk (Tablo 1) not edilebilir; özellikle incelenen sınıflar arasındaki büyük benzerlikler dikkate alındığında bu değer çok iyi olduğu kabul edilebilir. % 90'ın biraz altında olan bu değer, çoğunlukla farklı potentizasyon seviyeleri veya aynı kategoriye ait referans örnekleri için oluşturulan yanlış atamaların sonucunu temsil eder; incelenen üç sınıf arasında yalnızca 3 yanlış atama kaydedilmiştir - AUR, PW, UW (bir AUR200C örneği UW200C ile ilişkilendirilmiştir ve iki UW30C örneği sırasıyla AUR6C ve AUR200C'ye tahsis edilmiştir).

Dolayısıyla AUR kategorisi için diğer üç yanlış atama, grup içindeki farklı potentizasyon düzeyleri arasındaki benzerliklerden kaynaklanıyordu. Benzer bir davranış PW ve UW gruplarında da gözlemlendi. PW'nin AUR veya UW örneklerinden ayrılmasıyla ilgili herhangi bir hata yoktu. PW ve UW grupları içerisinde, 200C potens seviyesi için doğru tanıma gözlemlenirken, diğer potentizasyon seviyeleri için 5'e kadar örnek yanlış atanmıştır (bu maksimum ölçeğe PW6C sınıfında ulaşılmıştır).

Ancak GRU modeli bg ile ön işleme tabi tutulmuş veri kümesine uygulandığında sonuçlar yalnızca %59'luk bir doğruluk gösterdi (Şekil 4B ve Tablo 1). Araştırılan üç grup içinde büyük yanlış sınıflandırma sonuçları elde edildi, ancak aynı zamanda uygun grup dışındaki örneklere de bazı yanlış atamalar yapıldı. Bu sonuçlar, modelin zayıf tanıma kapasitesinin, Raman verilerine arka plan çıkarma işlemi uygulandığında meydana gelen bilgi kaybından kaynaklandığını göstermektedir. AUR ve UW grupları en çok etkilenenler gibi görünmektedir (Şekil 4B).

	GRU						SVM					
	ön işleme tabi tutulmamış			bg-ön işleme tabi tutulmuş			ön işleme tabi tutulmamış			bg-ön işleme tabi tutulmuş		
	prec	re	f1	prec	re	f1	prec	re	f1	prec	re	f1
AUR200C	0.88	1.00	0.94	0.73	0.53	0.62	0.64	0.60	0.62	0.35	0.40	0.38
AUR30C	1.00	0.87	0.93	0.60	0.40	0.48	0.52	0.73	0.61	0.10	0.13	0.11
AUR6C	0.81	0.87	0.84	0.63	0.80	0.71	0.36	0.33	0.34	0.17	0.20	0.18
PW	0.78	0.93	0.85	0.71	0.67	0.69	0.75	0.80	0.77	0.55	0.80	0.65
PW200C	0.83	0.67	0.74	0.46	0.73	0.56	0.53	0.53	0.53	0.50	0.53	0.52
PW30C	0.92	0.80	0.86	0.73	0.53	0.62	0.65	0.73	0.69	0.50	0.40	0.44
PW6C	0.88	1.00	0.94	0.57	0.53	0.55	0.64	0.47	0.54	0.17	0.13	0.15
UW	0.88	0.93	0.90	0.55	0.73	0.63	0.69	0.73	0.71	0.18	0.13	0.15
UW200C	0.93	0.87	0.90	0.78	0.47	0.58	0.64	0.60	0.62	0.58	0.47	0.52
UW30C	0.85	0.73	0.79	0.42	0.53	0.47	0.50	0.40	0.44	0.29	0.27	0.28
UW6C	0.94	1.00	0.97	0.64	0.60	0.62	0.80	0.80	0.80	0.55	0.40	0.46
macro avg	0.88	0.88	0.88	0.62	0.59	0.59	0.61	0.61	0.61	0.36	0.35	0.35
	Accuracy: 88 %			Accuracy: 59 %			Accuracy: 61 %			Accuracy: 35 %		

Tablo 1 - Ön işleme tabi tutulmamış ve taban çizgisi çıkarılmış (bg ile ön işleme tabi tutulmuş) Raman verileriyle elde edilen sınıflandırma sonuçları.

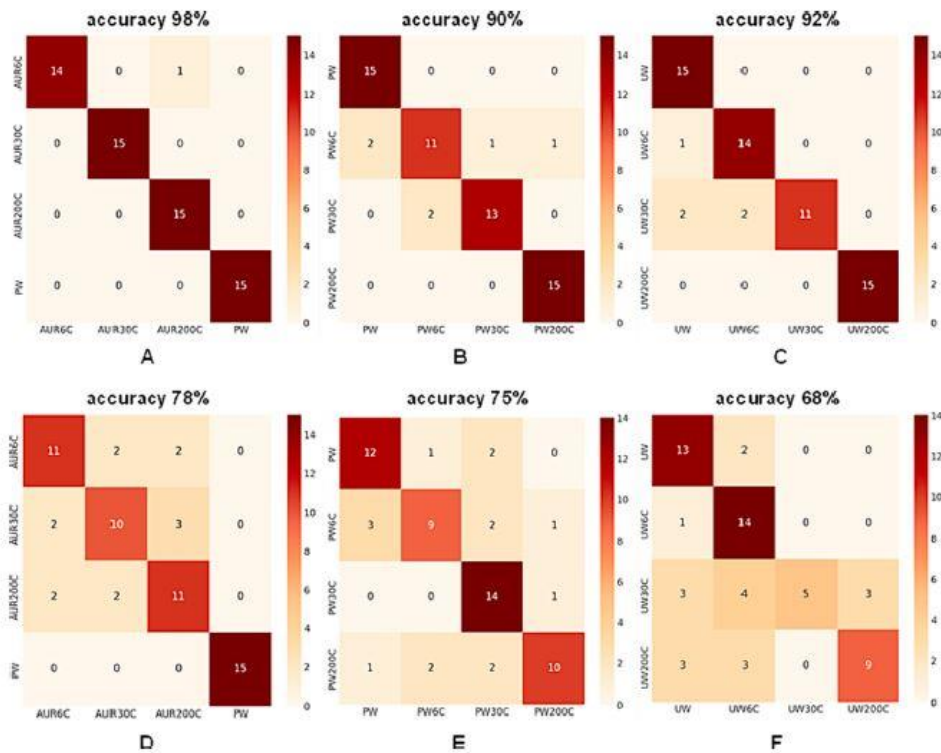
Tablo 1, önerilen yaklaşımın performans değerlerinin derinlemesine bir analizini sunmaktadır. Her sınıf için anlamlı veriyi tanımlama (precision), doğru veriyi gerçek sayıda tanımlama (recall) ve f1 değerleri bağımsız olarak belirlendi. Deneylerin sonuçları, iki veri seti için makro f1 puanlarının 0,88 ve 0,59 olduğunu gösterdi. Özellikle PW, PW6C, PW30C ve PW200C kategorileri her iki veri kümesinde de istikrarlı tanınma oranlarına sahiptir. Doğru veriyi gerçek sayıda tanımlama (recall) değerleri dikkate alındığında model, UW30C örneklerinin sınıflandırma doğruluğunu olduğundan düşük tahmin etme eğilimindedir. Bulgulara bakıldığında genel olarak bu modelin UW verilerini ayırt etme kabiliyetinin bir miktar sınırlı olduğu sonucuna varılabilir. Bu çalışma ayrıca, Raman verilerinin kategorize edilmesi için iyi bilinen bir makine öğrenimi yaklaşımının, özellikle de destek vektör makinelerinin (SVM) kullanımını araştırmaktadır. Derin öğrenme yöntemiyle (GRU) karşılaştırıldığında, geleneksel makine öğrenme tekniği (SVM) iki veri kümesi için en düşük doğruluk puanlarını verdi.

Bu sonuçlar dikkate alınarak daha derinlemesine bir araştırma yapılmış, yani veri kümesinin boyutunu artırmak için akıllı veri artırma yaklaşımı kullanılmıştır. Böylece spektral segmentasyon stratejisi kullanılarak her Raman spektrumu daha küçük segmentlere bölündü. Segmentin boyutları 1×1024 olarak bulunmuştur. Örneğin örnek büyüklüğü 1×12733 olarak belirlendiğinde toplamda 12 civarında benzersiz segment elde edilmektedir. Orijinal veri kümesi belirli bir sınıf için 15 örnek içerir. Segmentasyon işleminin tamamlanmasının ardından

veri seti 1980 × 1024 olarak yeniden boyutlandırılır ve 11 farklı sınıftan oluşur. Böylece sınıf başına örnek sayısı 180 olur. Veri seti daha sonra bölümlere ayrılır ve %80'i eğitim için, geri kalan kısım ise test için ayrılır. GRU modelimizin elde edilen segmentasyon veri kümeleri üzerindeki performansını ölçmek için beş katlı çapraz doğrulama uygulandı. Bu yaklaşımın ardından segment boyutunun artmasıyla performansın düşmesi arasında doğrudan bir ilişki olduğu tespit edildi. Örneklerin dahil edilmesiyle elde edilen test setlerinden elde edilen eneyssel sonuçlar Şekil S18 ve Tablo S1'de sunulmuştur; 11 sınıfta GRU modelimizin ön işleme tabi tutulmamış veriler için %99,45'lik yüksek doğruluk puanına ve bg ile ön işleme tabi tutulmuş veriler için %100'lük mükemmel doğruluk puanına ulaştığını görülmüştür. Çok sayıda sınıf içeren deneyler için en uygun spektral bölüştürme stratejisini önermeden önce daha fazla araştırma yapılması, yani daha fazla sayıda numuneyi içermesi gerekse bile, bu strateji bizim veri tipimiz için değerli bir veri toplama yaklaşımı olarak düşünülebilir.

3.2.2. GRU modelini kullanarak her gruptaki potansiyelleri derin öğrenmeyle sınıflandırmak

Her kategoride DL yöntemiyle elde edilen tanıma oranı (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) ve (UW, UW 6C, UW 30C, UW 200C) , ön işleme tabi tutulmamış ve bg ile ön işleme tabi tutulmuş Raman verileri dahil edilerek analiz edilmiş ve sonuçlar performans değerleri açısından karşılaştırılmıştır. Şekil 5, katmanlı 15 katlı çapraz doğrulama (CV) uygulandıktan sonra deneylerin bulgularını göstermektedir.



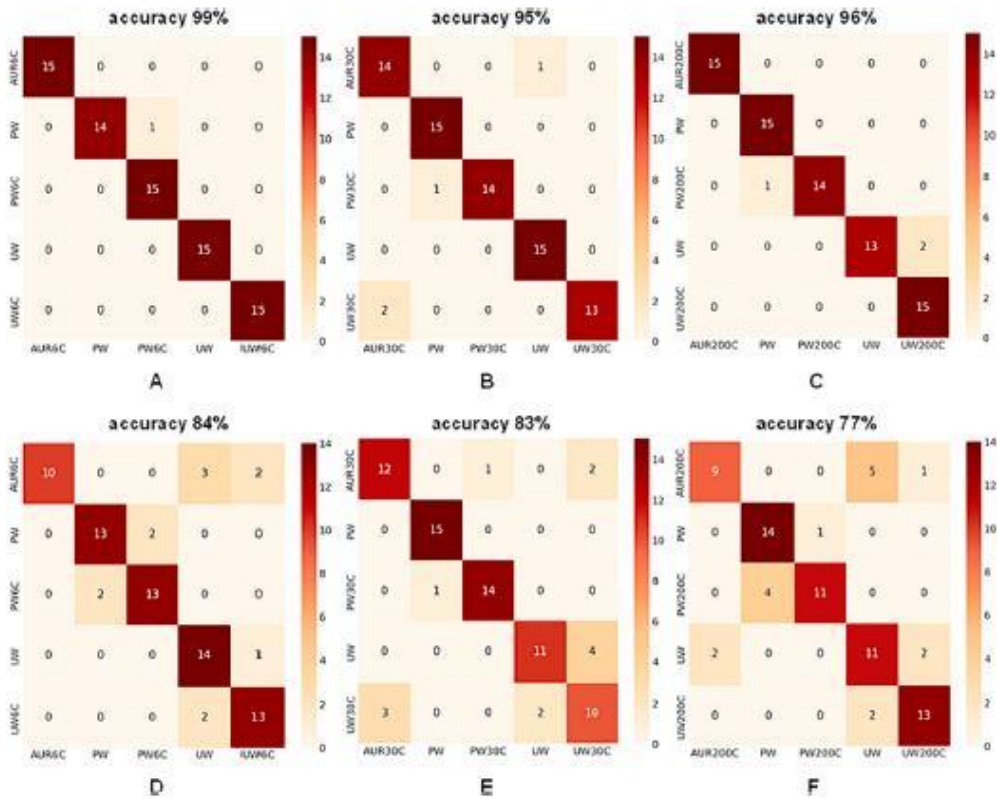
Şekil 5 - (A-B-C) ön işleme tabi tutulmamış ve (D-E-F) bg ile ön işleme tabi tutulmuş verileri kullanarak her grup içindeki ayrımcılığı değerlendirmek için derin öğrenme modeli performansı.

Doğrulama ve eğitim amacıyla numuneleri tahsis etmek için 15 kat bölme tekniği kullanılmış olup, burada 11 örnek doğrulama için seçilir ve geri kalan örnekler eğitim için belirlenir. AUR grubu için potentize edilmemiş PW sınıfı referans olarak kullanıldı.

AUR ve PW durumunda, üretilen karışıklık matrisleri %98 ve %78 doğruluğun elde edildiğini göstermektedir, Şekil 5A,D. Bulgular PW grubu için %90 ve %75 doğruluk gösterdi. Şekil 5B,E, UW grubu için %92 ve %68 doğruluk değerleri elde edilirken, Şekil 5C,F. Genel olarak PW6C ve UW30C grupları diğer sınıflara göre düşük performansa sahiptir. Genel bir analiz yapıldıktan sonra, AUR grubunun en az yanlış sınıflandırma örneğine sahip olduğu ve çoğu yanlış sınıflandırmanın 6C ve 30C sınıfları arasındaki büyük benzerlik nedeniyle meydana geldiği açıktır.

3.2.3. GRU modelini kullanarak derin öğrenmeyle aynı potansiyelleştirme düzeyinde sınıflandırma

Ayrıca DL'nin sınıfları ayırt etmedeki performansı Raman spektrumlarına dayalı olarak aynı potansiyelleştirme seviyesi analiz edildi (Şekil 6). Güçlendirme seviyelerini kategorilere ayırırken, potansiyelleştirilmiş AUR, PW ve UW örnekleri ve potansiyelleştirilmemiş PW ve UW örnekleri dahil olmak üzere referans olarak beş sınıfı dikkate aldık. Sonuçların analizi, 6C potansiyeli için GRU modelinden %99 (ön işleme tabi tutulmamış) ve %84 (bg ile ön işleme tabi tutulmuş) doğruluk değerlerinin elde edildiğini gösterdi. 30C potansiyeli için %95 (ön işleme tabi tutulmamış) ve %83 (bg ile ön işleme tabi tutulmuş) doğruluk değerleri de bulunmuştur. 200C potansiyeli için, GRU modeli %96 (ön işleme tabi tutulmamış) ve %77 (bg ile ön işleme tabi tutulmuş) doğruluk değerleri vermiştir. Böylece GRU modelinin en iyi performansı düşük seyreltme çözeltileri (6C) durumunda gözlemlenmiştir.



Şekil 6 - (A-B-C) ön işleme tabi tutulmamış ve (D-E-F) bg ile ön işleme tabi tutulmuş verileri kullanarak her potans düzeyindeki ayırt etmeyi değerlendirmek için derin öğrenme modeli performansı.

4. Tartışma

Ultra yüksek seyreltmelerin etkin tanımlanması için güvenilir teknikler bulma gerekliliği iyi bilinmektedir. Bu çalışmada, potentizasyon işleminden sonra elde edilen yüksek oranda seyreltilmiş çözeltilerin başarılı bir şekilde tanımlanması ve ayırt edilmesi için bir dizi yöntemin (TEM-EDX ve DL ile birlikte Raman spektroskopisi) kullanılmasının mümkün olduğunu gösterdik. TEM-EDX herhangi bir koloidal çözeltinin bileşimini ve morfolojisini değerlendirmek için kullanılabilir. Burada bu tekniğin yüksek oranda seyreltilmiş çözeltiler için bile etkili olduğunu, her potens seviyesiyle ilgili değerli bilgiler elde etmemize ve bu şekilde her bir potens seviyesiyle ilişkilendirilebilecek bir görüntü oluşturarak bunları ayırt etmemize olanak sağladığını gösterdik.

Genel bir gözlem olarak AUR 6C çözümü'nün morfolojisi olağan altın nanoparçacık koloidal (kendisi için çözücü olmayan) çözeltilerine benzer görünmektedir [45]; altın nanopartiküllerinin boyutu, sentez sürecinde kullanılan hammaddelerin doğasına bağlıdır. AUR'um diğer iki potensi olan 30C ve 200C durumunda, bunların tasarımının, bir fizik yasası temelinde yeni mimarilerin stratejik mühendisliğini öngören yapı yasası tarafından yönetildiği görülmektedir [46].

Si ve O, AUR 30C örneklerinde her yerde bulunan iki elementtir, demir (Fe), titanyum (Ti), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve alüminyum (Al) gibi safsızlıklar içeren izole edilmiş nanopartiküller, bileşenleri daha küçük olan E-AUR 30C numunesinde görülebilir (Şekil 2 ve Şekil S5-S7). Bu safsızlıklar ya kullanılan solventten kaynaklanır ya da potentizasyon işlemi sırasında cam şişelerden (örn. Si veya Ti) çözünerek oluşabilir. Bu safsızlıkların 30C potensinde bu kadar belirgin olmasının nedeni, histogramlarda gösterildiği gibi diğer iki potensin (6C ve 200C) bileşenlerinden daha küçük olan remedi bileşenlerinin boyutuna atfedilebilir Şekil 1C ve G, 2C ve G, ile 3C ve G. Ek olarak, W-AUR 30C örneğinde gözlenen filiform profil (Şekil 2D), E-AUR 30C'de bazı karbon (C) bazlı yapıların oluşumu (Şekil S7B)) ve iki 30C potens örneğinde (ilave Şekil 2 ve Şekil S5 ve S8B) altının varlığı vurgulanmalıdır.

Tüm bu gözlemler, AUR'nin 6C ve 30C potensleri için farklı bir organizasyon önermektedir ve 30C numunelerinde hem nanopartiküllerin hem de küme düzeneklerinin varlığına işaret etmektedir. Bu nedenle, safsızlıkların net nanopartikül şekli ve küçük yapılardan oluşan filiform/küme düzenekleri, en azından AUR 30C için gözlemlenen organizasyonun öncelikli olarak nanopartikülat sistemlerle değil, daha çok küçük yapıların oluşturduğu kümelerden oluşan büyük yapılar olduğu fikrini destekler. Büyük olasılıkla, bu kümeler aynı zamanda etanol ve su (E-AUR'da) veya su (W-AUR'da) molekülleri içerirken, izole edilmiş veya bu büyük topluluklara bağlı safsızlıklar, nanopartiküller (net yuvarlak şekil ve farklı boyutlarda) olarak görünmektedir. İncelenen örneklerin tamamında altın tanımlanmış olmasına rağmen, TEM-EDX haritalama görüntülerinde ızgara yüzeyinde dağınık olarak görünmektedir.

TEM-EDX çalışmasına ek olarak, Raman spektroskopisi ve DL'ye dayanan bir metodolojinin yapı olarak önemli ölçüde farklı olmayan solüsyonları, sınıflandırıp sınıflandıramayacağını araştırdık, i) PW ile UW solüsyonları karşılaştırdık, bu deneylerde UW olarak kullanılan su esasen kozmetikte kullanılan kısmen arıtılmış su yapısına sahiptir ve bu iki solüsyon arasında çok ince farklılıklar gözlemlendi; ii) PW ile AUR çözeltileri arasındaki farklar, AUR numunelerinde çok

düşük altın konsantrasyonlarının varlığı gözlemlendi. Ayrıca, su bazlı yapıların karmaşıklığı ve dinamiği, araştırılan Raman bölgesinde (özellikle OH gerilme aralığı) bir yanıt üretir, Sun [32] ve diğer bazı yazarlar [28-31] araştırmalarında bu yanıtları göstermişlerdir.

Araştırılan her üç durum için elde edilen sonuçlar tüm sınıfların sınıflandırılmasında (her bir grup içindeki potenslerin sınıflandırılması (AUR, PW ve UW) ve aynı potens seviyesinde sınıflandırma (6C, 30C ve 200C)) DL yaklaşımlarının kolaylıkla kullanılabilmesini göstermektedir. Çeşitli sınıfları etkili bir şekilde tanımlayabilmek için temel çizginin kaldırıldığı (yani bg ile ön işleme tabi tutulan) veri kümesinde GRU modeli, toplam içinde veri eğilimini yakalayamıyor. Bg ile ön işleme tabi tutulmuş veriler için daha iyi sonuçlar elde etmek amacıyla sayısal (quantized) normalizasyon kullandık. Ayrıca bu durumda, toplu normalleştirme tekniği yalnızca modelin son yoğun katmanından sonra uygulanmıştır. Mevcut çalışmanın genişletilmesi olarak iki aşamalı tanıma içeren bir model önerilebilir. İlk model, örnekleme tipinin belirlenmesinden sorumlu olacaktır, ikinci model ise test örneklerini örnek türü sınıfı içerisinde alt sınıflara ayırabilecektir. Bu prosedür önemli ölçüde daha fazla zaman alır ancak üstün sonuçlar ürettiğine inanılmaktadır. Ayrıca, 11 sınıfın tamamını kapsayan ayırım çalışması ve veri artırma yaklaşımı için elde edilen sonuçlara dayanarak, spektral bölümlendirme yönteminin kullanılması, model tahmin doğruluğunun artırılması için değerli bir strateji olarak görülebilir.

5. Sonuç

Genel olarak, TEM-EDX'ten elde edilen sonuçları ve Raman spektroskopisi ile DL algoritmalarına dayalı metodolojiyi analiz ederek, bu yöntemlerin ultra yüksek seyreltmelerin tanımlanması için başarıyla kullanılabilmesini iddia edebiliriz. Bu teknikler paketi, ilaçları hazırlamak için kullanılan başlangıç maddelerinin doğasına uygun olarak farklı ilaçları ayırt etmenin temelini oluşturabilecek veya örneklerin potansiyasyon seviyelerine göre ayırt edilmesine izin verebilecek bir yöntemi ortaya çıkardı. Bu yaklaşım, yüksek oranda seyreltilmiş çözeltilerin geçmişte mümkün olandan çok daha büyük bir ölçekte analiz edilmesine olanak tanır.

CRedit yazarlık katkı beyanı

Camelia Berghian-Grosan: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Denetleme, Metodoloji, Araştırma, Veri iyileştirme, Kavramsallaştırma.

Şahin Işık: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Yazılım, Metodoloji.

Alin Sebastian Porav: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Metodoloji, Araştırma.

İlknur Dağ: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Denetim, Metodoloji.

Kürşad Osman Ay: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Metodoloji, Araştırma.

George Vithoulkas: Yazma - inceleme ve düzenleme, Yazma - orijinal taslak, Metodoloji, Kavramsallaştırma.

Çıkar çatışması beyanı

Camelia Berghian-Grosan ve George Vithoulkas'ın makale yayınlama ücretleri Uluslararası Klasik Homeopati Akademisi tarafından sağlandı. George Vithoulkas, Uluslararası Klasik Homeopati Akademisi ile yönetim kurulu üyeliğini içeren bir ilişki olduğunu bildirdi. Başka yazarlar ise, bu makalede rapor edilen çalışmayı etkiliyor gibi görünen, birbiriyle çatışan mali çıkarların veya kişisel ilişkilerin bulunmadığını beyan ederler.

Veri kullanılabilirliği

Veriler istek üzerine sağlanacaktır.

Teşekkür

Yazarlar Destek için Uluslararası Klasik Homeopati Akademisi'ne (I.A.C.H.) - Alonissos (Yunanistan) teşekkürlerini sunar.

Bu araştırma için ve Dr. Drosos Kourounis'e bu yazının kalitesini önemli ölçüde artıran önerileri ve düzeltmeleri için teşekkür ederiz.

Homeopatik solüsyonların hazırlanması için Korres (Yunanistan, www.korres.com) Korres Eczanesi ve Bay George'a özel teşekkürler

Ek A. Ek materyal

Bu makaleye ilişkin ek verilere aşağıdaki linkten çevrimiçi olarak ulaşılabilir : <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>

References

- [1] S. Hahnemann, Organon of Medicine, 6th ed., B. Jain Publishers (P) Ltd, 2012.
- [2] T.F. Allen, *The encyclopedia of pure materia medica: a record of the positive effects of drugs upon the healthy human organism*, Boericke & Tafel, New York, 1874.
- [3] T.F. Allen, *A handbook of materia medica and homoeopathic therapeutics*, F.E. Boericke, Philadelphia, 1889.
- [4] J.T. Kent, *Lectures on Homoeopathic Materia Medica*, reprint, B. Jain Publications, 2005.
- [5] G. Vithoulkas, *Materia Medica Viva 1-3*, Homeopathic Book Publishers, London, 1995.
- [6] G. Vithoulkas, *Materia Medica Viva 4-13*, International Academy of Classical Homeopathy, Alonissos, 1997-2021.
- [7] P. Nandy, A review of basic research on homoeopathy from a physicist' s point of view, *Indian J. Res. Homoeopathy* 9 (2015) 141, <https://doi.org/10.4103/0974-7168.166372>.
- [8] P. Bellavite, M. Marzotto, D. Olioso, E. Moratti, A. Conforti, High-dilution effects revisited. 1. physicochemical aspects, *Homeopathy* 103 (2014) 4–21, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.003>.
- [9] P.S. Chikramane, D. Kalita, A.K. Suresh, S.G. Kane, J.R. Bellare, Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation, *Langmuir* 28 (2012) 15864–15875, <https://doi.org/10.1021/la303477s>.

- [10] P.S. Chikramane, A.K. Suresh, J.R. Bellare, S.G. Kane, Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective, *Homeopathy* 99 (2010) 231–242, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2010.05.006>.
- [11] G.S. Anagnostatos, G. Vithoulkas, P. Garzonis, C. Tavouxioglou, A working hypothesis for homeopathic microdiluted remedies, *Br. Homoeopath. J.* 81 (1992) 67, [https://doi.org/10.1016/S0007-0785\(05\)80310-2](https://doi.org/10.1016/S0007-0785(05)80310-2).
- [12] M.O. Kokornaczyk, S. Würtenberger, S. Baumgartner, Impact of succussion on pharmaceutical preparations analyzed by means of patterns from evaporated droplets, *Sci. Rep.* 10 (2020) 570, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57009-2>.
- [13] T.W. Randolph, E. Schiltz, D. Sederstrom, D. Steinmann, O. Mozziconacci, C. Schöneich, E. Freund, M.S. Ricci, J.F. Carpenter, C.S. Lengsfeld, Do not drop: mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 602–611, <https://doi.org/10.1002/jps.24259>.
- [14] A. Gerhardt, N.R. McGraw, D.K. Schwartz, J.S. Bee, J.F. Carpenter, T.W. Randolph, Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 1601–1612, <https://doi.org/10.1002/jps.23973>.
- [15] S. Novella, R. Roy, D. Marcus, I.R. Bell, N. Davidovitch, A. Saine, A. Debate, Homeopathy—Quackery or a key to the future of medicine? *J. Altern. Complement. Med.* 14 (2008) 9–15, <https://doi.org/10.1089/acm.2007.0770>.
- [16] V. Elia, M. Niccoli, New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions, *J. Therm. Anal. Calorim.* 75 (2004) 815–836, <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000027178.11665.8f>.
- [17] I. Botha, A.H.A. Ross, A nuclear magnetic resonance spectroscopy comparison of 3C trituration derived and 4C trituration derived remedies, *Homeopathy* 97 (2008) 196–201, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2008.08.008>.
- [18] M. van Wassenhoven, M. Goyens, M. Henry, E. Capieaux, P. Devos, Nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured copper (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls, *Homeopathy* 106 (2017) 223–239, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2017.08.001>.
- [19] M. van Wassenhoven, M. Goyens, E. Capieaux, P. Devos, P. Dorfman, Nanoparticle characterisation of traditional homeopathically manufactured *Cuprum metallicum* and *Gelsemium sempervirens* medicines and controls, *Homeopathy* 107 (2018) 244–263, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1666864>.
- [20] F. Esposito, U. Wolf, S. Baumgartner, NMR relaxation time investigation of highly diluted aqueous solutions of silica-lactose, *J. Mol. Liq.* 337 (2021) 115975, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115975>.
- [21] M. van Wassenhoven, M. Goyens, M. Henry, J. Cumps, P. Devos, Verification of nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured metal (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls, *Homeopathy* 110 (2021) 042–051, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710022>.
- [22] M. van Wassenhoven, M. Goyens, P. Dorfman, P. Devos, Particle characterisation of traditional homeopathically manufactured medicine *cuprum metallicum* and controls, *Int J High Dilution Res* 20 (2021) 11–28. <https://doi.org/10.51910/ijhdr.v20i4.1113>.
- [23] M. van Wassenhoven, B. Nysten, M. Goyens, P. Dorfman, P. Devos, D. Magnin, The ion partition detected in homeopathically manufactured medicine *cuprum metallicum* and controls, *Int. J. High Dilution Res.* 21 (2022) 67–84. <https://doi.org/10.51910/ijhdr.v21icf.1181>.
- [24] H.N. Bhargava, M. Sharma, A.K. Srivastava, N. Nambison, M.K. Gupta, M. R. Jadhav, K.S. Gavel, P.K. Baghel, M. Ahmed, Unraveling the low-frequency triggered electromagnetic signatures in potentized homeopathic medicine, *Mater. Sci. Eng. B* 292 (2023) 116365, <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2023.116365>.

- [25] E. Davenas, F. Beauvais, J. Amara, M. Oberbaum, B. Robinzon, A. Miadonnai, A. Tedeschi, B. Pomeranz, P. Fortner, P. Belon, J. Sainte-Laudy, B. Poitevin, J. Benveniste, Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE, *Nature* 333 (1988) 816–818, <https://doi.org/10.1038/333816a0>.
- [26] G. Vitoulkas, The controversy over the “Memory of Water”, *Med. Sci. Hypotheses* 4 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.12659/MSH.901167>.
- [27] B. Bagchi, *Water in biological and chemical processes: from structure and dynamics to function*, Cambridge University Press, 2013.
- [28] A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, The structural origin of anomalous properties of liquid water, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8998, <https://doi.org/10.1038/ncomms9998>.
- [29] L.G.M. Pettersson, R.H. Henchman, A. Nilsson, Water—the Most Anomalous Liquid, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7459–7462, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00363>.
- [30] J. Liu, X. He, J.Z.H. Zhang, L.-W. Qi, Hydrogen-bond structure dynamics in bulk water: insights from *ab initio* simulations with coupled cluster theory, *Chem. Sci.* 9 (2018) 2065–2073, <https://doi.org/10.1039/C7SC04205A>.
- [31] F. Perakis, L. De Marco, A. Shalit, F. Tang, Z.R. Kann, T.D. Kühne, R. Torre, M. Bonn, Y. Nagata, Vibrational spectroscopy and dynamics of water, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7590–7607, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00640>.
- [32] Q. Sun, The Raman OH stretching bands of liquid water, *Vib. Spectrosc* 51 (2009) 213–217, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2009.05.002>.
- [33] S. Guo, J. Popp, T. Bocklitz, Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning–based modeling, *Nat. Protoc.* 16 (2021) 5426–5459, <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00620-3>.
- [34] C.M. Bishop, *Neural networks for pattern recognition*, Clarendon Press, Oxford, 1995.
- [35] A. Gron, *Hands-on machine learning with Scikit-learn, Keras, and tensorflow: concepts, tools, and techniques to build intelligent systems*, 2nd ed., O’Reilly Media, 2019. C. Berghian-Grosan et al.
- [36] J.F. Díez-Pastor, S.E. Jorge-Villar, A. Arnaiz-González, C.I. García-Osorio, Y. Díaz- Acha, M. Campeny, J. Bosch, J.C. Melgarejo, Machine learning algorithms applied to Raman spectra for the identification of variscite originating from the mining complex of Gavà, *J. Raman Spectrosc.* 51 (2020) 1563–1574, <https://doi.org/10.1002/jrs.5509>.
- [37] J. Houston, F.G. Glavin, M.G. Madden, Robust classification of high-dimensional spectroscopy data using deep learning and data synthesis, *J. Chem. Inf. Model.* 60 (2020) 1936–1954, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01037>.
- [38] F. Lussier, V. Thibault, B. Charron, G.Q. Wallace, J.-F. Masson, Deep learning and artificial intelligence methods for Raman and surface-enhanced Raman scattering, *TrAC Trends Anal. Chem.* 124 (2020) 115796, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115796>.
- [39] Y. Lecun, L. Bottou, Y. Bengio, P. Haffner, Gradient-based learning applied to document recognition, *Proc. IEEE* 86 (1998) 2278–2324, <https://doi.org/10.1109/5.726791>.
- [40] K. Cho, B. Van Merriënboer, C. Gulcehre, D. Bahdanau, F. Bougares, H. Schwenk, Y. Bengio, Learning Phrase Representations using RNN Encoder–Decoder for Statistical Machine Translation, in: *Proceedings of the 2014 Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing (EMNLP)*, Association for Computational Linguistics, Doha, Qatar, 2014: pp. 1724–1734. <https://doi.org/10.3115/v1/D14-1179>.
- [41] M.H. Wathsala N. Jinadasa, A. C. Kahawalage, M. Halstensen, N.-O. Skeie, K.-J. Jens, Deep Learning Approach for Raman Spectroscopy, in: C. Shakher Pathak, S. Kumar (Eds.), *Recent Developments in Atomic Force*

- Microscopy and Raman Spectroscopy for Materials Characterization, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99770>.
- [42] R. Pascanu, T. Mikolov, Y. Bengio, On the difficulty of training Recurrent Neural Networks, 2013. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.1211.5063>.
- [43] KORRES Homeopathic Production Unit, An Introduction to Homeopathic Pharmacopoeia and Production Guidelines, (n.d.). <https://youtube/NkNe-33Q008> (accessed April 23, 2023).
- [44] OriginPro, OriginLab Corporation. Create and Subtract Baseline with Peak Analyzer <https://www.originlab.com/doc/Tutorials/Create-Subtract-Baseline> (accessed March 12, 2024).
- [45] F. Chen, Y. Wang, J. Ma, G. Yang, A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by tris(hydroxymethyl)aminomethane, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 220, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-220>.
- [46] A. Bejan, S. Lorente, The constructal law of design and evolution in nature, *Phil. Trans. R. Soc. B* 365 (2010) 1335–1347, <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0302>.
- [47] E.S. Rajendran, Homeopathy a material science: nanoparticle characterization of Aurum metallicum 6C, 30C, 200C, 1000C, 10000C, 50000C and 100000C, *Int. J. Curr. Res.* 9 (2017) 48923–48927.