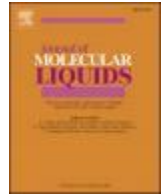




Contents lists available at  
ScienceDirect

Journal of Molecular Liquids



## Анализ на много високи разреждания: изследване на ефектите от потенцирането чрез електронна микроскопия, Раманова спектроскопия и дълбоко обучение

Камелия Бергиан-Гросан<sup>a</sup>, Шахин Исик<sup>b</sup>, Алин Себастиан Порав<sup>a</sup>, Илкнур Даг<sup>c,d</sup>, Курсад осман Ай<sup>c</sup>, Джордж Витулкас<sup>e</sup>

<sup>a</sup> *Национален институт за изследване и развитие на изотопни и молекулярни технологии, Клуж-Напока 400293, Румъния*

<sup>b</sup> *Факултет по компютърно инженерство, Университет Ескишехир Османгази, Ескишехир 26480, Турция*

<sup>c</sup> *Централна изследователска лаборатория за приложения и изследване, Университет Ескишехир Османгази, Ескишехир 26480, Турция*

<sup>d</sup> *Гимназия по професионални здравни услуги, Университет Ескишехир Османгази, Ескишехир 26480, Турция*

<sup>e</sup> *Егейски университет, Митилини 81100, Гърция*

### ЗА СТАТИЯТА

#### Ключови думи:

Argentum metallicum  
Ултра-високи разреждания  
Потенциране  
Клъстерни възли  
Изкуствен интелект  
Раманови данни

### РЕЗИОМЕ

Темата за много високите разреждания е обект на непрекъснат дебат от години главно поради ограничените възможности за анализ на такива разреждания. За тази цел бяха проведени проучвания с трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ) за оценка на морфологичните характеристики на силно разреждания на злато с разтворители етанол и вода като за всеки тип разтвор бяха изследвани три нива на потенциране (6С, 30С и 200С). В допълнение бяха включени Раманова спектроскопия и алгоритми за дълбоко обучение (DL) за анализ на трите нива на потенциране на пречистена вода, непречистена вода и пречистени разтвори на злато на водна основа. За всяка разглеждана категория бяха определени три партии. Разгледаха се и се обсъдиха разграничителните способности на методите в сравнение с резултатите от ТЕМ между всички изследвани класове, между потенциалите във всяка група или между класовете в рамките на едно и също ниво на потенциране. С помощта на ТЕМ бяха установени структурни подредби за трите нива на потенциране, докато моделът на затворена повтаряща се единица (GRU) показва голяма точност (88%) за разграничаване на всички класове, над 90% точност за разграничаване на пробите във всяка група и над 95% точност за класифициране в рамките на същото ниво на потенциране при използване на необработени Раманови спектри. По този начин наборът от методи (ТЕМ-EDX и Раманова спектроскопия в комбинация с DL) може успешно да се използва за описване и диференциране на силно разреждания, получени след потенциране. Освен това въз основа на резултатите, получени от проучването за определяне на всичките 11 класа и алгоритъма за увеличаване на данните, използването на метода за спектрална сегментация може да се разглежда като ценна стратегия за повишаване на точността на прогнозиране на модела.

### 1. Увод

Потенцирането е процес, който включва последователни разреждания и сукусии (енергично разклащане). За първи път е въведено от немския лекар Самуел Ханеман, който наблюдава, че разтворите на вещества, които са претърпели този процес, имат биологичен ефект при хората – с терапевтични доказателства [1]. Към днешна дата се използват огромен брой хомеопатични лекарства с отлично документирано действие [2–6]. Добиват се от много разнообразни източници, които се подлагат на потенциране, за да придобият своите лечебни свойства. В опит да се обясни действието на хомеопатичните лекарства са представяни няколко задълбочени хипотези [7–11]. Въздействието на сукусията (енергично разклащане) върху някои фармацевтични препарати, като Echinacea 10–2, Baptisia 10–3, Baptisia

10–4, Luffa 10–4 и Spongia 10–6, беше изяснен наскоро чрез помощта на изпаряване на капчици и статистически анализи; пробите са произведени в съответствие с правилата на Европейската фармакопея за хомеопатични лекарства и авторите са използвали 0, 10 или 100 сукуссионни удара. Резултатите показват значителни разлики за всички изследвани препарати [12]. Освен това механичните удари (като възбуждане, накарване) върху протеиновите разтвори водят до добре познати ефекти, за чието намаляване са проведени няколко проучвания [13,14]. В хомеопатията обаче разтърсването заедно с разреждането представляват основен начин за приготвяне на лекарствата. При потенцирани разтвори във високи разреждания (30С, 200С и т.н.) отвъд числото на Авогадро, определящо пределно разреждане 12 С,

Електронни пощи: [camelia.grosan@itim-cj.ro](mailto:camelia.grosan@itim-cj.ro) (К. Бергиан-Гросан), [george@vithoukaskas.com](mailto:george@vithoukaskas.com) (Дж. Витулкас).  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>

Получено 22 January 2024; Получено в редактиран вид 17 March 2024; Accepted 20 March 2024 Available online 21 March 2024

0167-7322/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

над което вече няма изходна субстанция, основният проблем идва от това, че не се очаква изходният материал да бъде открит дори в най-минимално количество [15]. Въпреки това в проучване, направено при лекарства, получени от метали, Чикрамейн и кол. [10] демонстрират чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ, електронна дифракция и индуктивно свързана плазмено-атомно-емисионна спектроскопия (ICP-AES) наличието на изходните вещества под формата на наночастици в много високи разреждания от 30С и 200С. През годините са използвани различни техники за описване на хомеопатично приготвени лекарства, като се подчертава наличието на специфични структури дори в силно разреждания лекарства [16–24]. Добре известно е сред научната общост, че скоро след публикуването на резултатите експериментът на Бенвенисте [25] е определен като неверен от научна комисия, изпратена от списание *Нейчър* в лабораторията на автора, както е посочено в статията на Джордж Витулкас *Спор относно паметта на водата* [26].

Водата е разтворител със специални свойства, който играе важна роля в биологичните и химичните процеси [27]. Затова е налице непрекъснат научен интерес към аномалните свойства на водата като течност и са проведени много експериментални и теоретични изследвания, за да се разбере нейният строеж [28, 29]. Въпреки това структурата и динамиката на водата все още са предмет на непрекъснат дебат [30]. Чувствителността на разтягане на ОН към различните среди позволява използването на вибрационна спектроскопия при изследване на структурата и динамиката на течната вода [28]. Изследването на течната вода чрез инфрачервена и Раманова спектроскопия разкрива широки пикове в областта на разтягане на ОН, което предполага много скрити взаимодействия, разнообразни по вид и обусловени от различни локални комбинации от водородни връзки, докато отделни пикове могат ясно да се видят в спектрите на леда [31]. През 2009 г. Sun [32] анализира течна вода в условията на околната среда чрез Раманова спектроскопия и предложи деконволюция в пет подленти на областта на разтягане на ОН. Сложната структура на водата и високите разреждания на изследваните разтвори обаче прави подобен анализ изключително трудна задача. За да се преодолеят тези пречки, към Рамановите сигнали за анализ и обучение на данни [33] бяха приложени хемометрични техники и съвсем наскоро – модели за машинно обучение (ML). [33].

ML алгоритмите стават в момента все по-популярни в приложенията за класификация [34,35]. Наскоро традиционните методи и алгоритмите за дълбоко обучение бяха успешно приложени за разграничаване на Рамановите спектри при различни сложни материали (напр. минерали) или класифициране на високоразмерни спектроскопични данни [36–38].

Дълбокото обучение (DL) е разновидност на ML, която е значително по-стабилна от методите, базирани на инженеринг на функции, използвани в миналото. Методите на DL имат много предимства, като пестят време, не изискват изработване на признаци и дават по-добри резултати. Изкуствените невронни мрежи, често известни като ANN, са предшественици на DL методите. ANN се състоят от входно ниво, едно или повече междинни нива (слоеве) и изходно ниво. Тези методи често се изграждат чрез контролирано обучение, което означава, че се използват предварително определени класификации за набор от данни в процеса на обучение. Конволюционната невронна мрежа (CNN) [39] – една от най-представителните DL мрежи, е вид невронна мрежа с права връзка, която използва конволюционни операции и много голям брой филтри. Има много различни, базирани на конволюция видове алгоритми за обучение, които могат да се използват според желаната задача. Обикновено 2-D CNN моделите се използват за приложения, управлявани от изображения. Моделът на затворена повтаряща се единица (GRU) [40,41] и 1-D CNN моделът се използват за решаване на задачи за прогнозиране или класификация, базирани на времеви серии. Ключов момент е, че повтарящите се модели имат потенциалната способност да запазят дългосрочни връзки между последователно подредени данни. Тези модели предоставят значителна помощ при разрешаването на проблема с изчезващия градиент [42].

Настоящият труд изследва структурата на потенцирани разтвори на основата на етанол и вода на злато на хомеопатично лекарство, наречено *Aurum metallicum* (AUR). Три високо

разредени (6С, 30С и 200С) разтвора на AUR са анализирани с ТЕМ от две независими лаборатории, разположени в Румъния и Турция. И двете лаборатории потвърждават различните структури на разтворите. Изборът на тези стотични разреждания е мотивиран от необходимостта да се изследват разтвори, съдържащи малки количества от първоначалното вещество, дори отвъд числото на Авогадро (т.е. последните две изследвани разреждания). Бяха получени също Раманови спектри за различни потенцирани разтвори на водна основа (пречистена вода (PW), непречистена вода (UW) и разтвор на злато на основата на PW (AUR)) и обработени от DL алгоритми, за да се изследва способността на моделите на GRU да разграничават между всички тези разтвори и класифицират пробите в рамките на изследваните категории (AUR, PW и UW) или в рамките на трите нива на потенциране (6С, 30С и 200С). DL беше използван за оценка на ефективността за класификация на Рамановите спектри. Прие се, че Рамановите спектри са времеви редове, поради което се приложи повтаряща се невронна мрежа. Проведохме експерименти с модела GRU, тъй като той решава както проблема с изчезващия градиент, така и проблема със скоростта. По този начин проверихме дали този класификационен модел има достатъчен капацитет да бъде използван в комбинация с Раманова спектроскопия за анализ на разтвори на водна основа, получени след потенциране. Получените от нас резултати ни позволиха да докажем, че този набор от методи (ТЕМ-EDX и Раманова спектроскопия в комбинация с DL) може да се използва успешно за описание и диференциране на силно разреждания разтвори, получени след потенциране

## 2. Материали и методи

### 2.1. Материали

Всички изследвани разтвори са изготвени от компанията Kogges (Атина, Гърция) – компания, сертифицирана от Националната агенция по лекарствата (ЕОФ – Гърция). Тези разтвори са произведени в съответствие с Германската хомеопатична фармакопея (GHP) и при спазване на препоръките за Добра производствена практика (GMP) [43] и придържане към тестовите за потвърждение на Европейската фармакопея за тестове при ясно посочени изключения. По-конкретно, изключенията се отнасят до разтворителите, използвани в последния етап от процеса на приготвяне: 50% v/v етанол за разтвори на основата на етанол и пречистена вода за разтвори на водна основа. Разтворите бяха категоризирани въз основа на изходния материал в три групи: пречистена вода (PW), непречистена вода (UW) и *Aurum metallicum* (AUR). За всяка категория бяха подготвени три нива на потенциране (6С, 30С и 200С) с три партии от всяко ниво на потенциране, произведени в различни дни. Системата за означаване С е свързана със стотично разреждане и означава 1 част от концентрирания разтвор/предварително потенциран разтвор към 99 части едурент (маса/маса).

За PW и UW пробите трябваше да се приготвят потенцирани разтвори, които са аналогични на лекарствените разтвори във всяко отношение, с изключение на липсата на активна лекарствена съставка. PW (съответствие съгласно Европейската фармакопея – Ph. Eur.) обикновено се използва за приготвяне на хомеопатични лекарства, докато UW е частично пречистена. Типовете вода, използвани в това проучване, имат следните характеристики, както е посочено от компанията Kogges: PW – проводимост 0,7–0,88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 6,4–6,8, NO – <0,2 ppm и метални йони, Al <3–5 ppb, As <0,005 ppm, Pb 0,00032 ppm, Cd <0,001 ppm, Hg <0,0005 ppm (общо тежки метали 0,00682 ppm, граница <0,1 ppm); UW – проводимост 196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 7,8, HCO – 66 ppm, Cl – 22 ppm, NO – 9,8 ppm, Na<sup>+</sup> 15 ppm, Ca<sup>2+</sup> 10 ppm, Mg<sup>2+</sup> 8,8 ppm, CO<sub>2</sub> 9,7 ppm. Така пречистена вода и съответно непречистена вода по Ph. Eur. са използвани като изходен материал. Ph. Eur. пречистена вода също се използва в процеса на разреждане и поради специфичните експериментални цели в процесите на приготвяне на 30С и 200С PW и UW разтвор.

За категория AUR беше включен метод, базиран на тритурация на *Aurum metallicum* с лактоза монохидрат като носител, първо до ниво 4С; след това, за да се получи течна потенция 6С, протоколът използва пречистена вода (съответствие съгласно Ph. Eur.) за приготвяне на потенция 5С и етанол 30%

(m/m) за изработване на течно разреждане 6С. Започвайки от 6С и до 29С, и съответно до 199С, в процеса на приготвяне се използва Ph. Eur. пречистена вода. Крайните потенцирани разтвори от 30С и 200С бяха приготвени с етанол 50% (v/v) за базирани на етанол AUR разтвори. Поради специфичните експериментални цели Ph. Eur. пречистена вода е използвана в процесите на приготвяне на 30С и 200С, базирани на вода AUR разтвори.

### 2.1.1 Трансмисионна електронна микроскопия

За изследванията на TEM бяха включени два вида проби от AUR; първият тип AUR, приготвен в 50% v/v разтвор на етанол, беше анализиран в Румъния и означен с E-AURA, докато вторият тип AUR беше приготвен само в пречистена вода (PW) и беше анализиран в Турция (означен с W-AUR). И за двата вида AUR бяха изследвани три потенцирани проби, а именно 6С, 30С и 200С.

### 2.1.2 Раманови проучвания

За Рамановите проучвания са използвани три вида разтвори: пречистена вода (PW), непречистена вода (UW) и AUR. За PW и UW групите допълнително разгледахме непотенцирани проби (референтни проби от видовете вода, използвани за процеса на потенциране) и три вида потенцирани водни проби (6С, 30С и 200С); за всеки тип потенцирани водни проби бяха приготвени три партиди в три различни дни. За категорията AUR бяха изследвани само потенцираните разтвори на водна основа. Бяха подготвени общо 12 проби за PW, 12 проби за UW и 9 проби за AUR.

### 2.2. Методи

#### 2.2.1. TEM и EDX процедури в Румъния

Структурното и морфологично описание на пробите на AUR е осъществена на сканиращ трансмисионен електронен микроскоп (STEM) Hitachi HD-2700, оборудван с детектор за вторични електрони (SE), детектор за предавани електрони (TE) (Hitachi High Tech., Япония) и пистолет за излъчване на студено поле, предназначен за изображения с висока разделителна способност (HRTEM) с разделителна способност 0,144 nm. Покритите с въглерод TEM решетки се обработват с 6 µl от потенцираните разтвори на AUR, които преди това бяха сукусирани 10 пъти за хомогенизиране. След 1-2 минути излишната течност се попива с филтърна хартия Whatman клас 1 и решетките се оставят да изсъхнат на въздух. Пробите бяха анализирани с помощта на системата STEM, работеща при 200 kV. За EDX изследванията беше използвана двойна EDX система, състояща се от X-Max N100TLE силициев дрейф детектор (SDD) (Oxford Instruments)..

#### 2.2.2. TEM и EDX процедури в Турция

TEM изображения на трите потенци (6С, 30С и 200С) на AUR бяха получени с помощта на TEM Hitachi HT 7800, работещ при ускоряващо напрежение от 100 kV. След като всяка проба беше разтърсена 10 пъти, върху решетка с въглеродно покритие се капна 1 капка и се остави да изсъхне в чиста среда. EDX анализът на проби беше извършен с помощта на Oxford Instruments X-MaxN, свързан към същото TEM устройство, за да се потвърди наличието на злато.

Хистограмите, подготвени както за румънските, така и за турските TEM изображения, бяха реализирани въз основа на данни, получени със софтуер ImageJ (NIH, САЩ).

#### 2.2.3. Раманова спектроскопия

Рамановите спектри бяха записани на Раманов спектрометър NRS-3300 (Jasco, Япония), оборудван с детектор със свързано зарядно устройство (CCD), използвайки 514.5 nm лазерно възбуждане (зелена светлина). Разтворите се анализират в стъклени капиллярни тръби (Marienfeld, Германия) с диаметър 1,5-1,6 mm. За записване на спектрите на Раман от приблизително 72 cm<sup>-1</sup> до 4020 cm<sup>-1</sup> бяха използвани обектив Olympus U MPLFL 20X, решетка 600 l/mm, процеп 0,1 × 6 mm, време на експозиция от 120 s и три сканирования. За калибриране на спектрометъра беше използван пикът от 521 cm<sup>-1</sup>, съответстващ на Si. Необработените и шумови данни не са премахнати или изгладени, а от набора от данни не са отстранени отклоненията. Предварителната обработка на данни включваше две основни стъпки и беше направена със Spectra Manager (JASCO) и OriginPro 2023 (OriginLab Corporation). При първата стъпка на предварителна обработка на данни се избра интервал на вълново число от 180 до 4000 cm<sup>-1</sup> и се ограничи броят на характеристиките до под 13000 чрез прилагане на сплайн метод от 3-ти ред със стъпка на данните от 0,3.

Тези данни бяха допълнително нормализирани до [0,1] и взети като необработени Раманови данни за DL изследване. Втората стъпка включваше процес на извеждане на нулевата линия (bg), който беше приложен в OriginPro към данните, получени преди нормализиране от първата стъпка. За да се приложи bg процесът, бяха извършени следните стъпки: дефиниран от потребителя режим на нулева линия, метод на 2-ра производна (нули) за откриване на опорна точка, прилепване към спектър, метод на интерполация на линията и същия брой базови точки като входни данни [44]. Получените данни бяха допълнително нормализирани до [0,1] преди използването им при съставянето на предварително обработените с bg набори от данни за изследването DL.

#### 2.2.4. Дълбоко обучение

Изследванията с DL бяха извършени с помощта на езика за програмиране Python и Colab Pro, който осигурява ускорена изчислителна среда. Моделът GRU е изграден и обучен с помощта на библиотеката Keras 2.12.0. За обучение на модел с голям размер на партида беше използван GPU Colab Tesla T4 с общо 2560 CUDA ядра, както и изчислителни 3.7, 15 GB памет и GDDR6 VRAM. Освен това беше използван пакетът Sklearn 1.2.2 за анализиране и обяснение на получените резултати. Повече подробности относно протокола за DL разследвания са представени във файла с допълнителни материали и фигури S1 и S2.

## 3. Резултати

За да установим възможностите на предложения от нас метод за описание на различни разтвори и потенци, първоначално се насочихме към определяне на свойствата на пробите чрез TEM анализ.

### 3.1. Изследване с TEM

TEM е ценен инструмент, който предоставя основни данни за устройството на наноматериалите. Тези познания са от голяма важност за разбирането и развитието на материалознанието, както и за области, използващи силно разреждени разтвори, които също са съставени от наноструктури.

#### 3.1.1. Aurum metallicum 6С

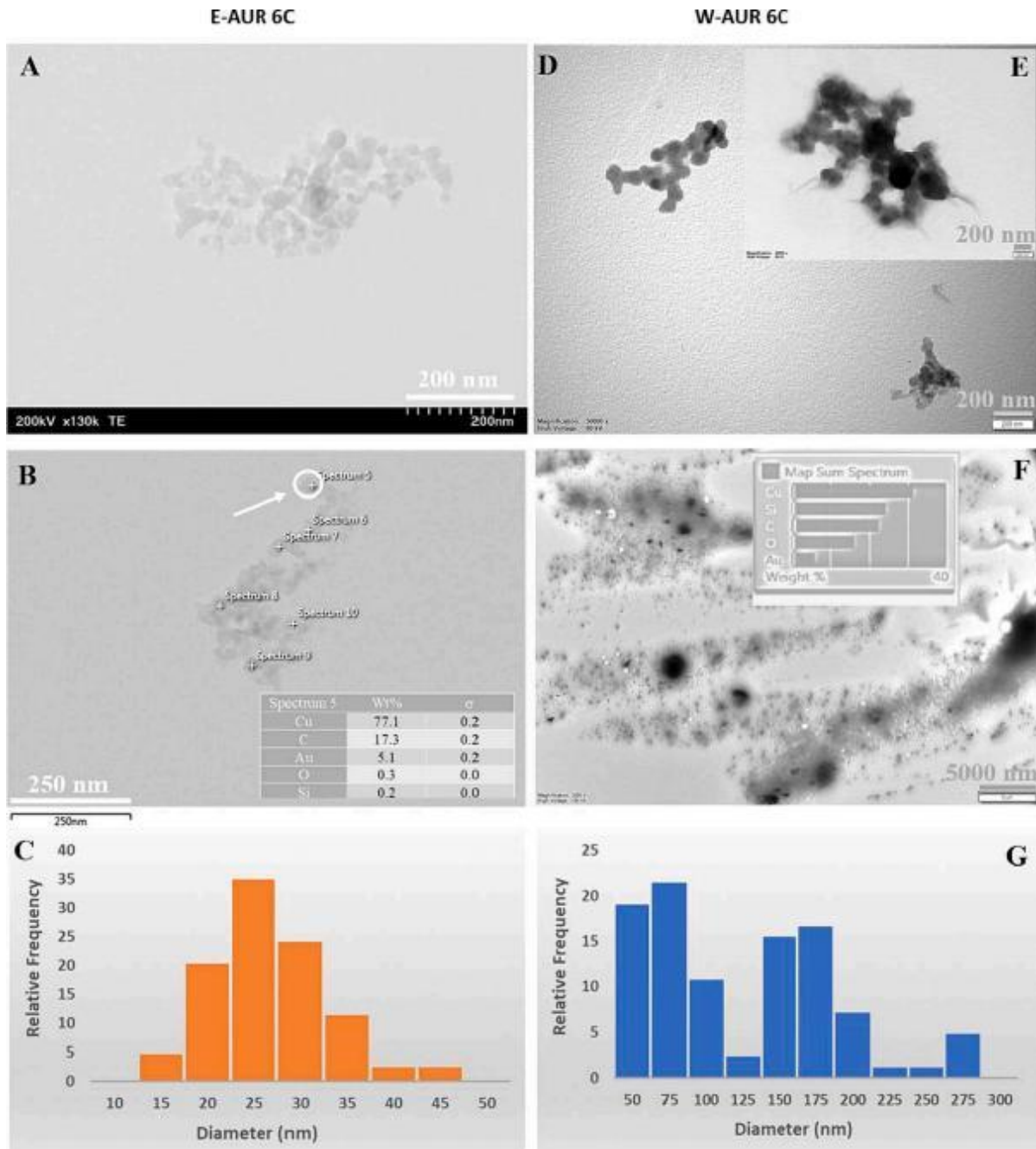
Фиг. 1 представя няколко TEM изображения, получени с два различни инструмента (вижте раздела *Методи*) за потенци 6С на AUR. Използвани са две различни среди за подготовка на пробите – първата среда е 50% v/v разтвор на етанол, който е използван за AUR пробите, анализирани в Румъния (E-AUR 6С). Втората среда беше пречистена вода, използвана за пробите, изследвани в Турция (W-AUR 6С).

Въпреки съществените разлики в разтворителите получените TEM изображения са доста сходни по отношение на формата на наночастиците. Размерът на наночастиците обаче зависи от вида на разтворителя. Това се установява в хистограмите на двете проби, които показват по-малки наночастици при E-AUR 6С, отколкото при W-AUR 6С (фиг. 1С и G), най-вероятно защото етанолът е по-ефективен като стабилизиращ агент от водата. Данните EDX (графики към Фиг. 1 и Фигури S3 и S4) показват сравними проценти злато (Au) в двете проби и наличието на силиций (Si) и кислород (O) (медта (Cu) е от решетката).

#### 3.1.2. Aurum metallicum 30С

Освен това беше изследвана потенци 30С на AUR; Фиг. 2 и Фиг. S5-S8 показват TEM изображенията, EDX данните и резултатите от картографирането на TEM-EDX за тази потенци. Тук си струва да споменем приликите между двете проби – E-AUR 30С и W-AUR 30С, по отношение на формата на наноструктурата и появата на примеси.

Както в предишния случай, потенци 6С, размерът на наночастиците/наноструктурите на потенци 30С е с тенденция да бъде по-малък за E-AUR, отколкото за W-AUR (фиг. 2С и G); това поведение се обяснява със способността на етанола да действа като ефективен стабилизиращ агент. Освен това хистограмите на фиг. 1 и 2 показват по-малки наноструктури в E-AUR 30С



**Фиг. 1.** TEM данни за AUR потенция 6C. (A-C) TEM изображения и хистограма на относителната честота на размерите на наночастиците за пробите на базата на станол на AUR и (D-G) за пробите на водна основа; добавени – EDX данни за маркираните точки или сумарния спектър

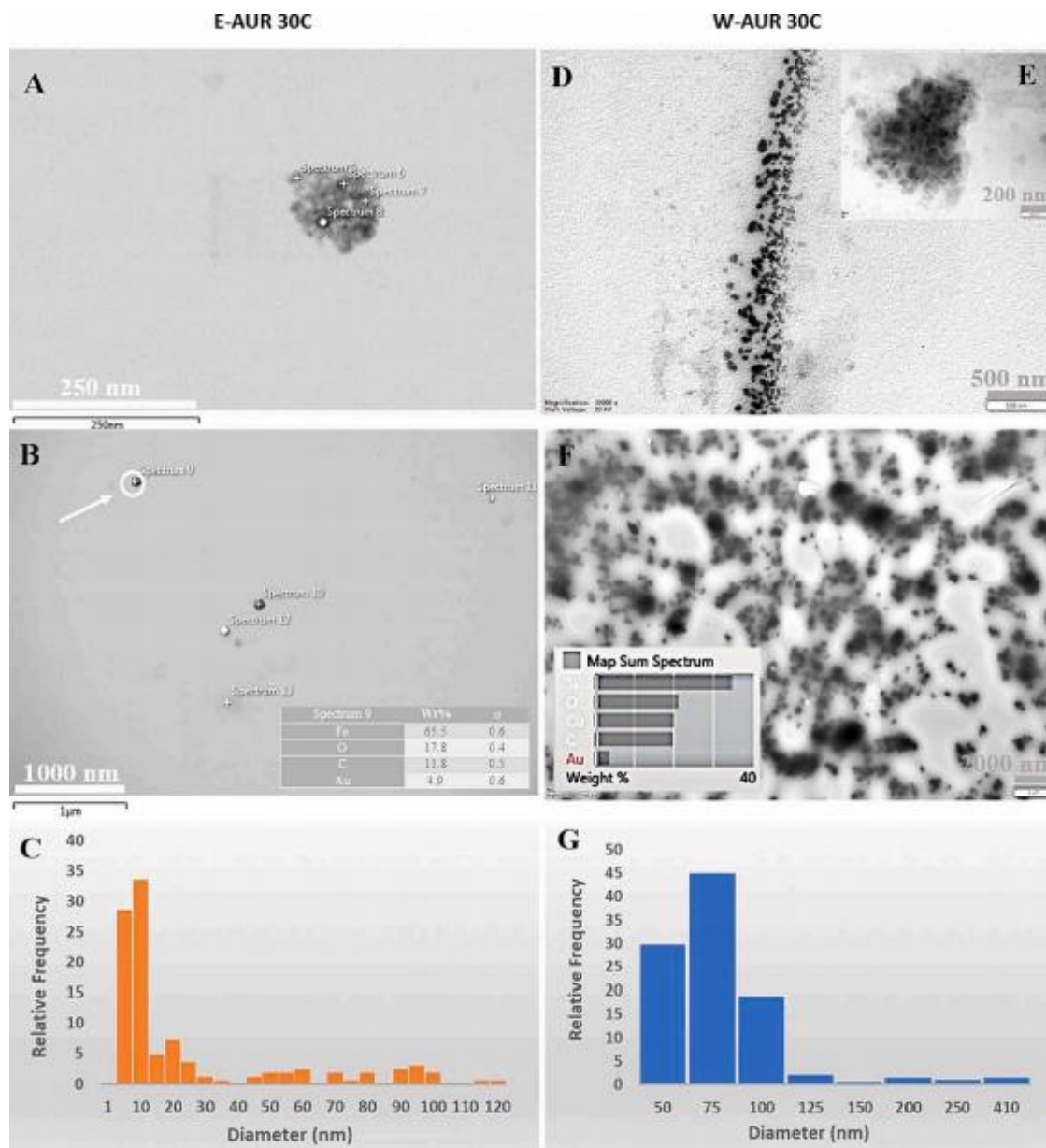
от E-AUR 6C и значително намаление на размера с повече от 150 nm спрямо пробите на водна основа; тези големи структури се виждат ясно в W-AUR 6C, но в пробата W-AUR 30C се установяват само следи. Значителната промяна в профилите на двете потенции 6C и 30C се появява след процеса на потенциране, който включва няколко последователни разреждания и сукусии.

**3.1.3. Aurum metallicum 200C**

Характеристиките на потенцията 200C са илюстрирани на Фиг. 3 и Фиг. S9-S11 и са получени чрез анализиране на две проби (E-AUR 200C – приготвен с помощта на воден 50% v/v разтвор на станол, и W-AUR 200C – получен само с пречистена вода).

Общата тенденция, наблюдавана за потенции 6C и 30C, също присъства тук; по-точно размерът на наноструктурите в пробата E-AUR 200C е по-малък от тези в W-AUR 200C, както се вижда от хистограмите на Фиг. 3. Освен това и за двете проби 200C наночастиците са по-големи от наблюдаваните наночастици при потенциция 30C и са много различни по размер и форма от наночастиците при потенциция 6C (Фиг. 1-3).

Различна организация и пълна липса на примеси в някои кълъстери AUR 200C се виждат ясно на Фиг. 3B. Освен това и в двете проби AUR 200C преобладава модел на разклонено свързване (Фиг. 3A и D) и наличието на малки количества примеси като Si и Fe в тези кълъстери се демонстрира от EDX данните, представени във вмъкването на Фиг. 3, Фиг. S9 и S11B.



**Фиг. 2.** TEM данни за AUR потенция 30C. (A-C) TEM изображения и хистограма на относителната честота на размерите на наночастиците за проби на базата на етанол на AUR и (D-G) за пробите на водна основа; добавени – EDX данни за маркираните точки или сумарния спектър

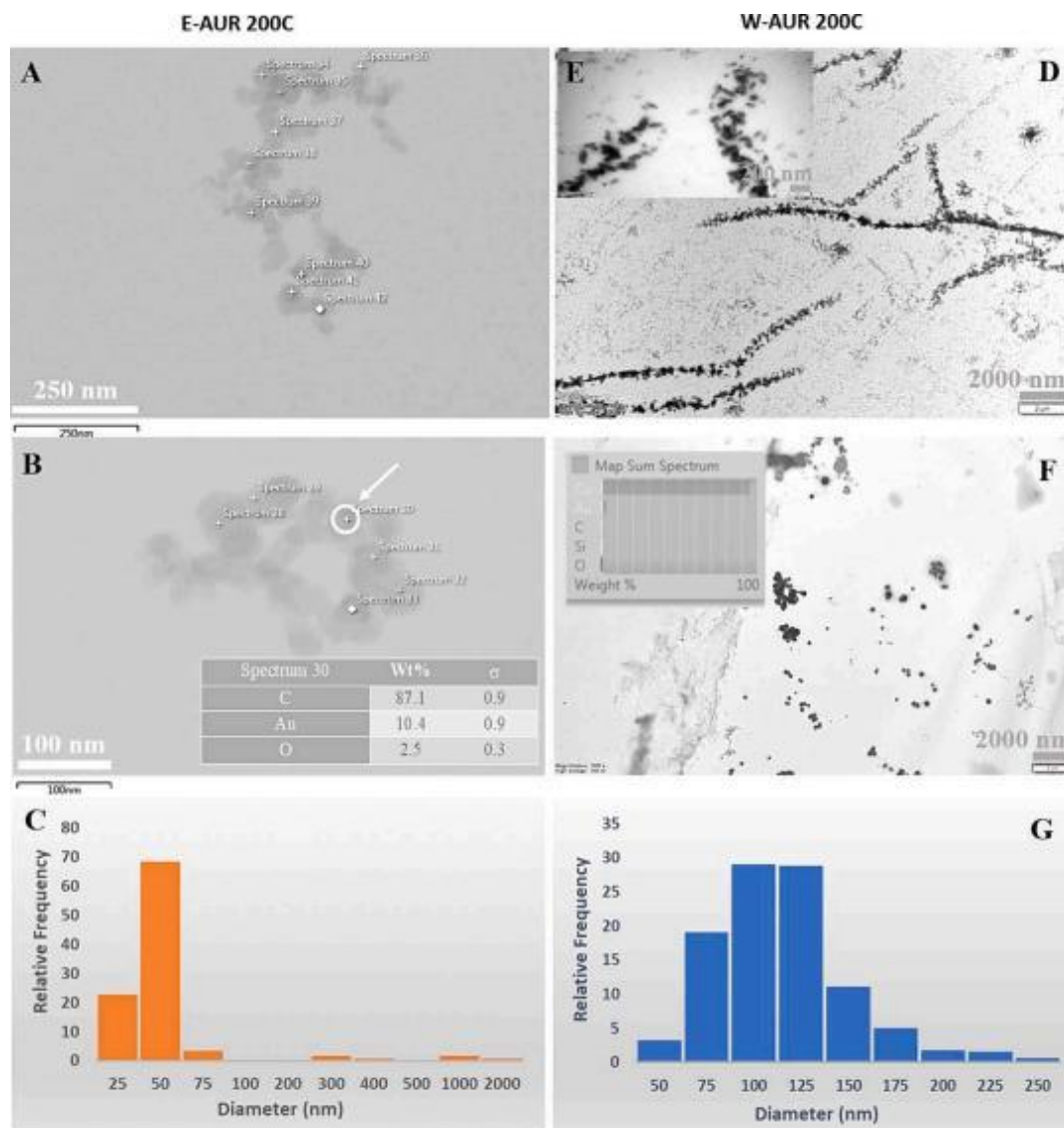
### 3.2. Раманова спектроскопия и изследвания за дълбоко обучение

След провеждане на изследванията с TEM може да се използва бърз и недеструктивен метод като Раманова спектроскопия за анализ на изследваните разтвори. Рамановата спектроскопия беше приложена само към разтворите на водна основа поради по-големите струпвания в пробите на водна основа, наблюдавани при TEM и специфичните особености на Рамановата спектрометрия при водно-етанолните разтвори. Целта беше да се изследват преобразуванията, които се появяват в три групи/категории: PW, UW и AUR. PW обикновено се използва за приготвяне на хомеопатични лекарства, докато UW е частично пречиствена форма на вода. Тези видове вода имат различни характеристики. Тук отбелязваме ниската проводимост на PW пробите (0,7-0,88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) и техните ниски нива на йони ( $\text{NO}^- < 0,2$  ppm,  $\text{Al} < 3-5$  ppb, общо тежки метали 0,00682 ppm); освен това UW пробите имат по-висока проводимост (196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), както и по-високи концентрации на различни йони (нитрат, бикарбонат, натрий и др.). Вижте раздела *Материали и методи* за повече подробности.

Потенцирането беше приложено към PW, UW и AUR проби, приготвени в три различни дни, за да се получат три партии от потенцирани проби при потенциции 6C, 30C и 200C. PW и UW обикновено не се потенцират за комерсиални цели; процедурата за потенциране е приложена към тях само за това проучване. По този начин бяха анализирани 33 проби чрез Раманова спектроскопия. Всяка проба беше анализирана в 5 точки, за да се получат представителни данни за изследваните разтвори. Общо 165 Раманови спектри (диапазон 180-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) бяха подложени на класификационното изследване. Суворите и предварително обработени чрез bg Раманови спектри по време на този експеримент за различни нива на потенциране (6C, 30C и 200C) на изследваните типове проби (PW, UW и AUR) са показани на Фиг. S12-S17.

#### 3.2.1. Класифициране на всички класове с дълбоко обучение чрез използване на модела GRU

Резултатите от класифицирането с Раманова спектрометрия за 11 различни класа, получени с помощта на обученния GRU модел, са показани на Фиг. 4. Бяха разгледани както необработените, така и предварително обработените с bg набори от данни.



**Фиг. 3.** TEM данни за AUR потенция 200C. (A-C) TEM изображения и хистограма на относителната честота на размерите на наночастиците за пробите на базата на етанол на AUR и (D-G) за пробите на водна основа; добавени – EDX данни за маркираните точки или сумарния спектър

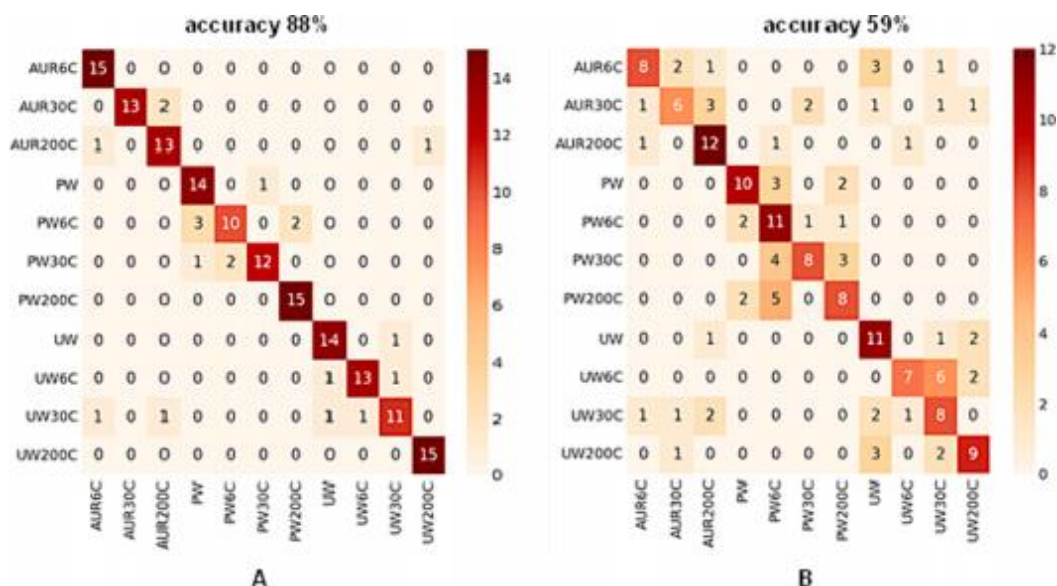
Матрицата на обкръване се представя за обобщение на броя на случаите на правилно или погрешно предсказване на резултата с модела на GRU. Моделът демонстрира много добър капацитет за разпознаване при сравняване на трите изследвани категории; по този начин той показва голяма ефективност при разграничаване между категориите AUR, PW и UW, когато се вземат необработени данни от Раманова спектрометрия (Фиг. 4A). В този случай може да се отбележи точност от 88% (Таблица 1); тази стойност може да се счита за много добра, особено ако се вземат предвид големите прилики между изследваните класове. Тази стойност, която е малко по-малко от 90%, представлява най-вече резултат от грешни присвоения, генерирани за различни нива на потенциране или референтни проби, принадлежащи към същата категория; само 3 грешни присвоения са регистрирани между трите изследвани класа – AUR, PW, UW (една проба от AUR200C беше свързана с UW200C и две проби от UW30C бяха разпределени съответно с AUR6C и AUR200C).

По този начин за категорията AUR другите три грешни присвоения се дължат на приликите между различните нива на потенциране в групата. Подобно поведение се наблюдава и в групите PW и UW. Няма грешки, свързани с диференцирането на PW от AUR или UW проби. В рамките на групите PW и UW се наблюдава правилно разпознаване за нивото на потенция 200C,

докато при другите нива на потенциране до 5 проби бяха погрешно присвоени (този максимум беше достигнат в клас PW6C).

Въпреки това, когато моделът GRU беше приложен към предварително обработения с bg набор от данни, резултатите показаха точност от само 59% (Фиг. 4B и Таблица 1). Основни неточности в класифицирането бяха получени в рамките на трите изследвани групи, но имаше и някои грешни присвоения на проби извън правилната група. Тези резултати показват, че слабият капацитет за разпознаване на модела се дължи на загубата на информация, когато към Рамановите данни е приложено изваждане на фона. Групите AUR и UW изглеждат най-засегнати (Фиг. 4B).

Таблица 1 представя задълбочен анализ на стойностите на ефективност на предложения подход. Стойностите за прецизност, recall и f1 за всеки клас бяха независимо определени. Резултатите от експериментите показват, че макро f1 резултатите за двата набора от данни са 0,88 и 0,59. По-специално, категориите PW, PW6C, PW30C и PW200C имат стабилни нива на разпознаване и в двата набора от данни. Когато се вземат предвид стойностите за recall, моделът има тенденция да подценява точността на класификацията на пробите UW30C. От констатациите може да се заключи, че като цяло дискриминационната сила на този модел за UW данните е донякъде ограничена.



Фиг. 4. Матрица на обръкване на модела GRU за (A) необработени и (B) bg-предварително обработени данни от всички изследвани категории

Таблица 1

Класификация на резултатите, получени с необработени (unpretreated) и извадени от базовата линия (предварително обработени (bg-pretreated) Раманови данни

	GRU						SVM					
	unpretreated			bg-pretreated			unpretreated			bg-pretreated		
	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
	<b>Accuracy: 88%</b>			<b>Accuracy: 59%</b>			<b>Accuracy: 61%</b>			<b>Accuracy: 35%</b>		

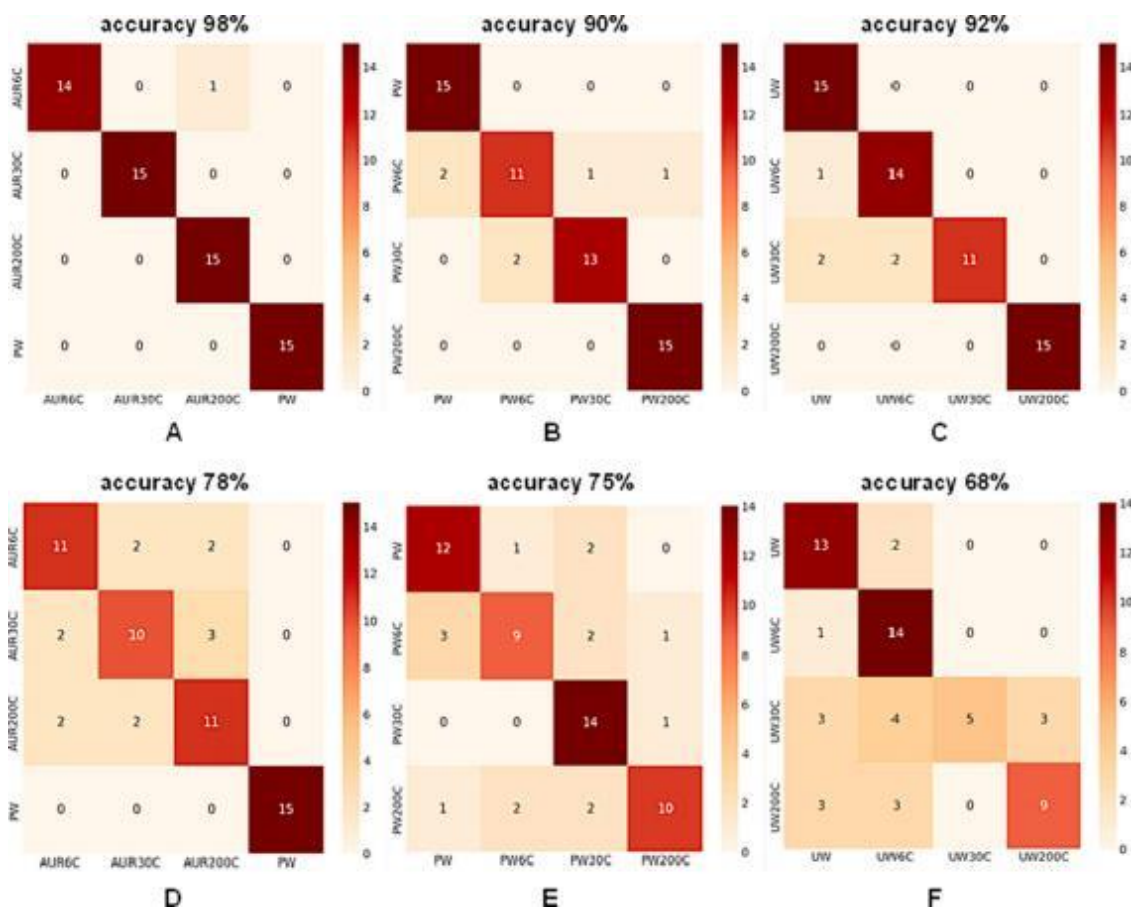
Освен това изследването проучва използването на добре познат подход за машинно обучение, по-специално поддържащи векторни машини (SVM), за категоризиране на Раманови данни. В сравнение с метода на дълбоко обучение (GRU), традиционната техника за машинно обучение (SVM) даде най-ниските резултати за точност за двата набора от данни.

Като се имат предвид тези резултати, беше проведено по-задълбочено проучване и беше приложен метод за увеличаване на данните. По този начин, чрез използване на стратегия за спектрално сегментиране, всеки Раманов спектър беше разделен на по-малки сегменти. Установено е, че размерите на сегмента са 1x1024. Например, когато размерът на извадката е решен да бъде 1x12733, се получават общо около 12 уникални сегмента. Оригиналният набор от данни съдържа 15 екземпляра за определен клас. След завършване на процедурата по сегментиране наборът от данни се преоразмерява до 1980x1024 и се състои от 11 отделни класа. Така размерът на пробите за клас става 180. След това наборът от данни се разделя, като 80% се разпределят за обучение, а останалата част е запазена за целите на тестването. За измерване на ефективността на нашия GRU модел върху получените набори от данни за сегментиране беше приложено петкратното кръстосано валидиране. Следвайки този подход, беше установено, че има пряка връзка между увеличаването на размера на сегмента и намаляването на

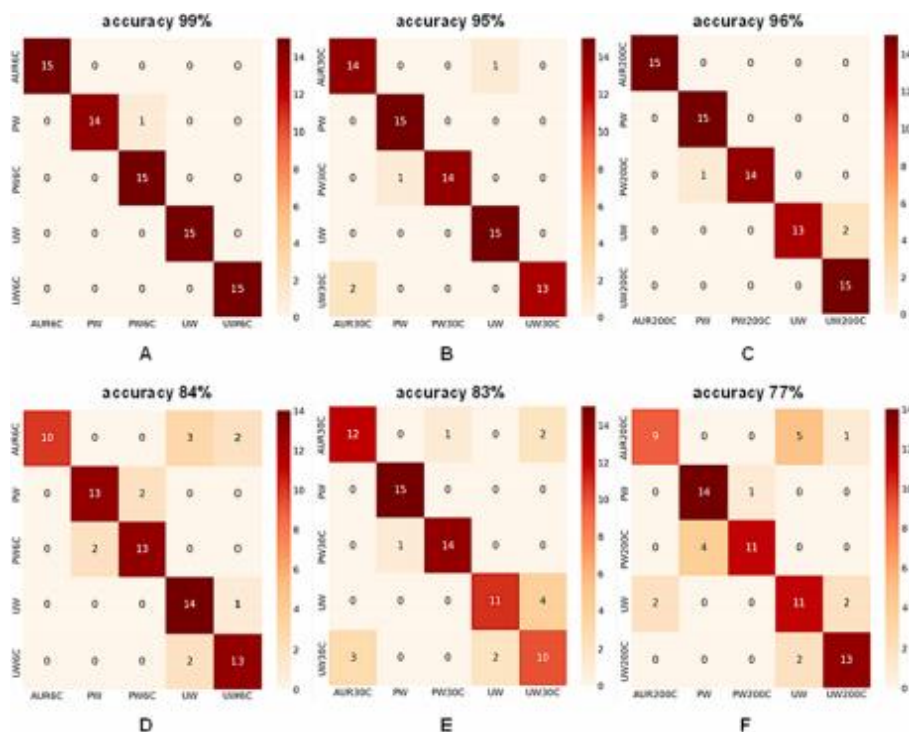
производителността. Експерименталните резултати, представени на Фиг. S18 и Таблица S1, получени чрез включване на проби от наборите за тестване, демонстрират, че нашият GRU модел постига висока оценка на точност от 99,45% за необработени данни и перфектна оценка на точност от 100% за предварително обработени (bg-ML) данни в 11 класа. Дори ако трябва да се направят допълнителни изследвания, т.е. включващи по-голям брой проби, преди да се предложи стратегията за спектрално сегментиране като най-подходяща за експерименти, съдържащи голям брой класове, тази стратегия може да се счита за ценен подход за увеличаване на данните за нашия тип данни.

### 3.2.2. Класифициране на потенции във всяка група с дълбоко обучение чрез използване на модела GRU

Степента на разпознаване, получена с метода DL във всяка категория (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) и (UW, UW 6C, UW 30C, UW 200C), беше анализирана чрез включване на необработени и предварително обработени с bg Раманови данни. Резултатите бяха сравнени по отношение на стойностите на ефективността. Фигура 5 илюстрира резултатите от експериментите след прилагане на стратифицирано 15-кратно кръстосано валидиране (CV).



Фиг. 5. Ефективност на модела за дълбоко обучение за оценка на дискриминацията във всяка група, използвайки (A-B-C) необработени и (D-E-F) bg-предварително обработени данни



Фиг. 6. Ефективност на модела за задълбочено обучение за оценка на дискриминацията в рамките на всяко ниво на потенциране, използвайки (A-B-C) необработени и (D-E-F) bg-предварително обработени данни



За да разпределим проби за целите на валидирането и обучението, използвахме техника на 15-кратно разделяне, при която 11 извадки бяха избрани за валидиране, а останалите извадки – за обучение. За групата на AUR като референтен беше използван класът PW, който не е потенциран.

В случая на AUR срещу PW получените матрици на обръкване показват, че са получени 98% и 78% точност, Фиг. 5A, D. Резултатите показват точност от 90 и 75% за PW групата, Фиг. 5B, E, докато за UW групата са получени стойности на точност от 92% и 68%, Фиг. 5C, F. Като цяло групите PW6C и UW30C имат по-ниски резултати в сравнение с другите класове. След извършване на общ анализ става ясно, че групата AUR има най-малко случаи на погрешни класификации и че повечето грешки възникват поради голямата степен на прилика между класовете 6C и 30C.

### 3.2.3. Класифициране в рамките на едно и също ниво на потенциране с дълбоко обучение чрез използване на модела GRU

Освен това беше анализирана ефективността на DL при разграничаването на класове в рамките на едно и също ниво на потенциране въз основа на техните Раманови спектри (Фиг. 6). При категоризирането на нивата на потенциране разгледахме пет класа, включително потенцираните проби AUR, PW и UW и непотенцираните проби PW и UW като референтни. Анализът на резултатите показва, че при 6C потенциите са получени стойности на точност от 99% (необработени) и 84% (bg-обработени) от модела GRU. Стойности на точност от 95% (необработени) и 83% (bg-обработени) също бяха открити за 30C потенциите. За 200C потенциите моделът GRU дава стойности на точност от 96% (необработени) и 77% (bg-обработени). Така най-доброто представяне на модела GRU се наблюдава в случай на разтвори с ниско разреждане (6C).

## 4. Дискусия

Необходимостта от намиране на надеждни техники за ефикасно описване на много високи разреждания е добре известна. В това проучване показваме, че е възможно да се използва набор от методи (TEM-EDX и Раманова спектроскопия в комбинация с DL) за успешно характеризирани и диференцирани на силно разреждания разтвори, получени след потенциране. TEM-EDX може да се използва за оценка на състава и морфологията на всеки колоиден разтвор. Тук показваме, че тази техника е ефективна дори за силно разреждания разтвори, което ни позволява да получим ценна информация, свързана с всяко ниво на потенциране, и по този начин да ги разграничим чрез създаване на изображение, което може да бъде свързано с всяко ниво на потенциране.

Като общо наблюдение морфологията на разтвора AUR 6C изглежда подобна на тази на познатите колоидни разтвори от златни наночастици [45]; размерът на златните наночастици зависи от естеството на суровините, използвани в процеса на синтез. При другите две потенци на AUR – 30C и 200C, структурата се определя от съзидателния закон, който предвижда стратегическо изграждане на нови структури, базирани на закона на физиката. [46].

Si и O са двата елемента, присъстващи навсякъде в пробите AUR 30C, докато изолирани наночастици, съдържащи примеси като желязо (Fe), титан (Ti), калций (Ca), магнезий (Mg) и алуминий (Al) се виждат в проба E-AUR 30C, чиито структурни единици са по-малки (Фиг. 2 и Фиг. S5-S7). Тези примеси произхождат или от използвания разтворител, или се образуват по време на процеса на потенциране чрез разтваряне от стъклените флакони (напр. Si или Ti). Причината, поради която тези примеси са толкова забележими в потенци 30C, може да се дължи на размера на лекарствените частици, които са по-малки от тези на другите две потенци (6C и 200C), както е изобразено на хистограмите на Фиг. 1C и G, 2C и G, и 3C и G. В допълнение трябва се обърне внимание на нишковидният профил, наблюдаван в пробата W-AUR 30C (Фиг. 2D), присъствието на въглеродни структури (C) в E-AUR 30C (Фиг. 10B) и наличието на злато в двете проби с потенци 30C (добавка на Фиг. 2 и Фиг. S5 и S8B).

Всички тези наблюдения предполагат различна структура на потенциите на AUR 6C и 30C и показват наличието както на наночастици, така и на клъстерни струпувания в пробите 30C. По този начин ясната форма на наночастици на примесите и нишковидните/клъстерни струпувания, образувани от малки структури, насочват към хипотезата, че поне за AUR 30C наблюдаваната структура не е представена от наночастици, а от големи струпувания (клъстери) от малки частици. Най-вероятно тези клъстери съдържат също молекули етанол и вода (в E-AUR) или вода (в W-AUR), докато примесите, свободни или свързани с тези големи струпувания, се явяват като наночастици (с ясна кръгла форма и различни размери). Въпреки че златото се открива във всички изследвани проби, то изглежда разпръснато върху повърхността на решетката в картографските изображения на TEM-EDX.

Резултатите, получени за пробите AUR 200C, представят голям обем на молекулите AUR 200C, което показва наличието на стабилни и сложни частици структури върху по-голяма площ. Примесите присъстват като големи групи (Фиг. S10B); по този начин големи примеси (в мащаб от микрометри), като Si, Al, Fe и O, свързани заедно, също могат да се видят в резултатите от картографирането на TEM-EDX. Нишковидният профил може да бъде отбелязан и за пробите W-AUR 200C (Фиг. 3A, 3D), както и присъствието на въглеродни (C) структури в E-AUR 200C (Фиг. S10A и S10C) и наличие на злато в двата типа изследвани проби от 200C (вложка на Фиг. 3, Фиг. S9 и S11B).

Някои от тези резултати са подкрепени от литературни източници: наличието на злато дори при високи потенци (30C и 200C) на AUR, които са извън числото на Авогадро, е представено в статиите на Чикрамейн и колектив [10] и Раджендран [47]. В разработката на Чикрамейн и колектив елементният състав на TEM частиците е идентифициран чрез електронна дифракция на избрана площ (SAED) и потвърден чрез ICP-AES анализ [10]. Проучването на Раджендран подчертава идеята, че във всички разтвори се срещат наночастици предимно от мащаба на квантовите точки [47]; размерите на частиците им се доближават до нашите данни. Тази представа за наночастиците също се подкрепя от нашите открития, но в допълнение резултатите ни показват, че структурата на AUR съчетава наночастици и клъстери, съставени от по-малки или по-големи наноструктури. Тези клъстери се наблюдават повече при високите разреждания, които са извън числото на Авогадро, и се влияят от природата на разтворителя и от нивото на потенциране; колкото по-висока е потенцията, толкова по-разклонени и по-големи са формираните структури. Разширяването на тази подредба върху голяма площ би трябвало да доведе до структури, които са по-стабилни, и биха могли да бъдат в съответствие с конструктивния закон за подреждане и еволюция в природата, както е описано от Вежан и Лоренте [46].

В допълнение към изследването TEM-EDX проучихме дали методологията, базирана на Раманова спектроскопия и DL, е в състояние да класифицира решения, които не се различават значително по структура, като i) PW срещу UW решения, показващи фини разлики, тъй като UW, използвана в тези експерименти, по същество е частично пречистена вода, използвана в козметиката, и ii) PW срещу AUR разтвори, където разликите се дължат на наличието на много ниски концентрации на злато в AUR пробите. Нещо повече, сложността и динамиката на структурите на водна основа предизвикват реакция в изследваната Раманова област (особено диапазона на разтягане на OH), както е показано от Сън [32] и няколко други автори [28–31].

Резултатите, получени за всичките три проучени възможности – класифициране на всички класове, класифициране на потенци в във всяка група (AUR, PW и UW) или класифициране в рамките на едно и също ниво на потенциране (6C, 30C и 200C), показват, че DL подходите могат да се използват за лесно и ефективно разпознаване на различни класове. В набора от данни с премахната нулева линия (а именно bg-предварително обработени) GRU моделът не е в състояние да улови цялостно тенденцията на данните. За да постигнем по-добри резултати за bg-предварително обработени данни, използвахме квантована нормализация. В този случай обработването с партидна нормализация е приложено само след последния

плътен слой на модела. Модел с два етапа на разпознаване може да се използва като продължение на настоящото изследване. Първият модел може да се използва за определяне на типа на пробата, докато вторият – за разделяне на тестовите проби на подкласове в рамките на класа на типа на пробата. Този процес отнема значително повече време, но се смята, че дава превъзходни резултати. Освен това въз основа на резултатите, получени за определянето на всичките 11 класа и подсилване на данните, използването на метода за спектрална сегментация може да се разглежда като ценна стратегия за повишаване на точността на прогнозиране на модела.

## 5. Заключение

Като цяло чрез анализиране на резултатите, получени от TEM-EDX и методологията, базирана на Раманова спектроскопия и DL алгоритми, можем да твърдим, че тези методи могат да бъдат успешно използвани за характеризирани на много високи разреждания. Този набор от методи показва качества, които могат да бъдат основа за разграничаване на различни лекарства в съответствие с естеството на изходните вещества, използвани за приготвяне на лекарствата, или да позволи определяне на проби в зависимост от тяхното потенциране. Този подход позволява анализ на силно разредените разтвори в много по-голям мащаб, отколкото беше постижимо в миналото.

## CRedit авторство и принос

**Камелия Бергиан-Гросан:** концептуализация, методология, изследване, писане – оригинална чернова, писане – преглед и редактиране; **Шахин Ишик:** официален анализ, софтуер, писане – оригинална чернова, писане – преглед и редактиране; **Алин Себастиан Порав:** изследване, писане – преглед и редактиране; **Илкнур Даг:** изследване, писане – преглед и редактиране; **Курсад Осман Ай:** изследване, писане – преглед и редактиране; **Джордж Витулкас:** концептуализация, писане – оригинална чернова, писане – преглед и редактиране..

## Декларация за конкурентни права

Камелия Бергиан-Гросан и Джордж Витулкас съобщават, че таксите за публикуване на статията са предоставени от Международната академия по класическа хомеопатия. Джордж Витулкас съобщава за отношения с Международната академия по класическа хомеопатия, които включват членство в Борда на директорите. Другите автори декларират, че не са им известни конкурентни финансови интереси или лични взаимоотношения, които биха могли да повлияят на изследването, представено в тази статия.

## Достъпност на данните

Данните мога да бъдат предоставени при поискване.

## Благодарности

Авторите биха искали да благодарят на Международната академия за класическа хомеопатия (I.A.C.H.) – Алонисос (Гърция), за предоставената подкрепа за това изследване и на д-р Дросос Курунис за неговите предложения и корекции, които значително подобриха качеството на този ръкопис. Изказваме специални благодарности на аптека *Корес* и г-н Джордж Корес (Гърция, www.korres.com) за подготовката на хомеопатичните разтвори.

## Приложение А. Допълнителен материал

Допълнителни данни към тази статия могат да бъдат открити на <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>.

## Препратки

- [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 homeopathic 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 homeopathy from a physicist, *s point of view*, *Indian J. Res. Homeopathy* 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. I. 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. Homeopath. 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. Sch'oneich, 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.v21ief.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. Miadonna, 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. Vithoulkas, 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.
- [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 Gaván, *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. Shaker 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.
- [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.