

Analyse ultrahoher Verdünnungen: Untersuchung der Auswirkungen der Potenzierung durch Elektronenmikroskopie, Raman-Spektroskopie und Deep Learning

Autoren Camelia Berghian-Grosan, Sahin Isik, Alin Sebastian Porav, Ilknur Dag, Kursad Osman Ay, George Vithoukas

Highlights

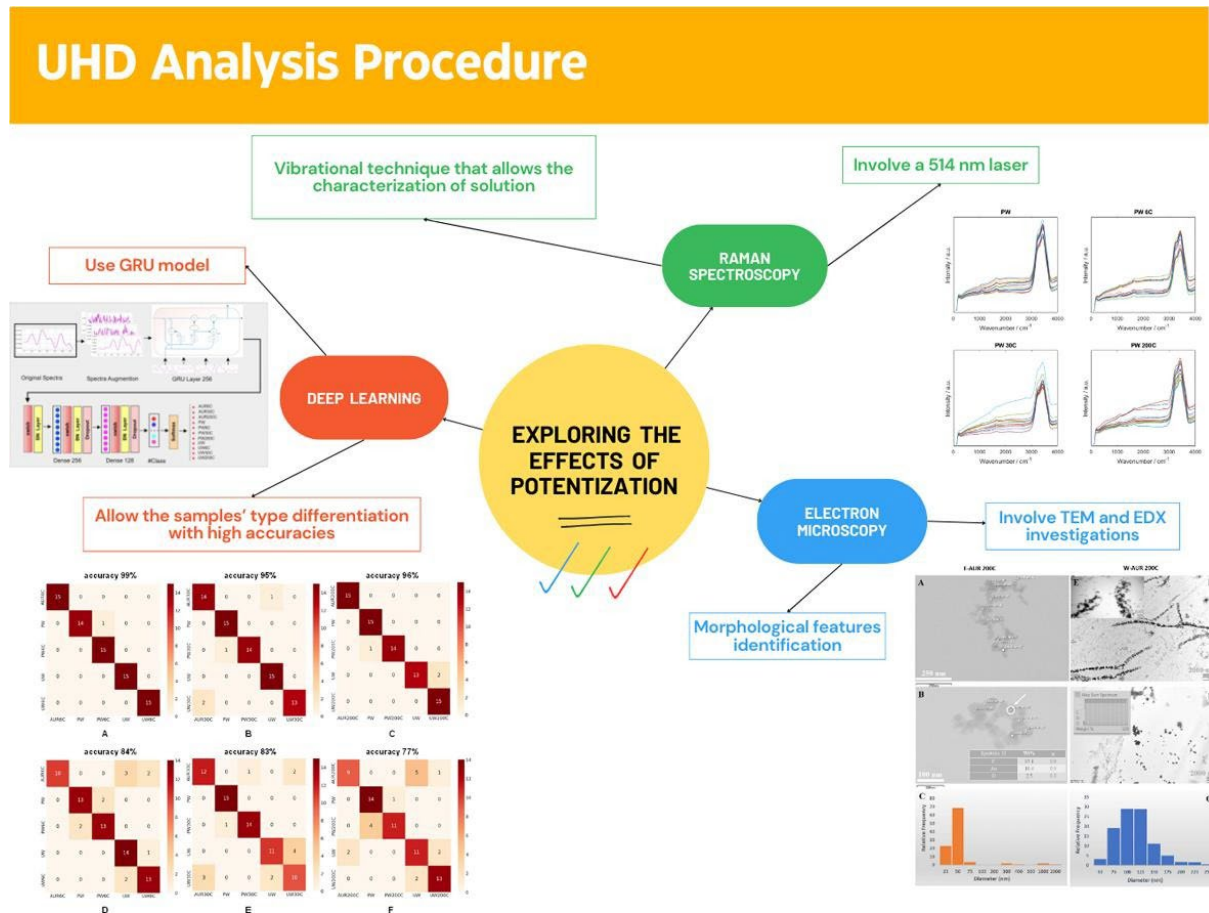
- Es wird ein Protokoll für die Auswertung ultrahoher Verdünnungen (UHD) vorgeschlagen.
- Morphologische Untersuchungen von 6C, 30C und 200C AUR-Lösungen wurden durch TEM-EDX-Messungen durchgeführt.
- In der Differenzierungsstudie der UHD-Lösungen wurden gereinigtes Wasser, ungereinigtes Wasser und Aurum-metallicum-Gruppen verwendet.
- Zur Typunterscheidung der Proben wurden Raman-Spektroskopie und Deep-Learning-Algorithmen eingesetzt.

Zusammenfassung

Das Thema ultrahoher Verdünnungen wurde im Laufe der Jahre immer wieder diskutiert, vor allem weil die Möglichkeiten zur Analyse solcher verdünnten Lösungen begrenzt sind. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen mit Transmissionselektronenmikroskopen (TEM) durchgeführt, um die morphologischen Eigenschaften von hochverdünnten Goldlösungen auf Ethanol- und Wasserbasis zu bewerten; für jeden Lösungstyp wurden drei Potenzierungsstufen (6C, 30C und 200C)* untersucht. Darüber hinaus wurden Raman-Spektroskopie und Deep-Learning-Algorithmen (DL) zur Analyse der drei Potenzierungsstufen von Goldlösungen auf Basis von gereinigtem Wasser, ungereinigtem Wasser und gereinigten wasserbasierten Lösungen eingesetzt. Für jede betrachtete Kategorie wurden drei Chargen bewertet und die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen allen untersuchten Klassen, zwischen den Potenzen innerhalb jeder Gruppe oder zwischen den Klassen innerhalb derselben Potenzierungsstufe wurde in Korrelation mit den TEM-Ergebnissen vorgestellt und diskutiert. Durch TEM wurden für die drei Potenzierungsstufen unterschiedliche Organisationsformen aufgedeckt, während das Gated Recurrent Unit (GRU)-Modell eine hohe Genauigkeit (88 %) bei der Unterscheidung aller Klassen, eine Genauigkeit von über 90 % bei der Unterscheidung der Proben innerhalb jeder Gruppe und eine Genauigkeit von über 95 % bei der Klassifizierung innerhalb derselben Potenzierungsstufe zeigte, wenn nicht vorbehandelte Raman-Spektren verwendet wurden. Daher kann diese Methodenreihe (TEM-EDX und Raman-Spektroskopie in Kombination mit DL) erfolgreich zur Charakterisierung und Differenzierung stark verdünnter Lösungen nach einer Potenzierungsbehandlung verwendet werden. Angesichts der Ergebnisse der Unterscheidungsstudie mit allen 11 Klassen und einem Datenerweiterungsansatz kann die Methode der spektralen Segmentierung außerdem als wertvolle Strategie zur Verbesserung der Modellvorhersagegenauigkeit angesehen werden.

*Anmerkung Übersetzer: 30C ist gleichbedeutend mit C30, entsprechendes gilt auch für die anderen Potenzstufen und folgenden Textstellen.

Grafische Zusammenfassung:



Schlüsselwörter

Aurum metallicum - Ultrahohe Verdünnungen – Potenzierung - Cluster-Assemblierungen - Künstliche Intelligenz - Raman-Daten

1. Einleitung

Potenzierung ist ein Verfahren, das aufeinanderfolgende Verdünnungen und Verschüttelungen (kräftiges Schütteln) umfasst. Es wurde erstmals vom deutschen Arzt Samuel Hahnemann eingeführt, der feststellte, dass Lösungen von Substanzen, die diesem Verfahren unterzogen wurden, eine biologische Wirkung auf den Menschen haben - mit therapeutischem Nachweis [1]. Bis heute wurden zahlreiche homöopathische Mittel verwendet, und sie sind sehr gut dokumentiert [2], [3], [4], [5], [6]. Sie werden aus einer Vielzahl von Substanzen gewonnen, die einer Potenzierung unterzogen werden, um ihre heilenden Eigenschaften zu erhalten. Mehrere aufschlussreiche Perspektiven haben versucht, die Wirkung homöopathischer Mittel zu erklären [7], [8], [9], [10], [11]. Die Auswirkungen der Verschüttelung (kräftiges Schütteln) auf einige pharmazeutische Präparate wie Echinacea 10^{-2} , Baptisia 10^{-3} , Baptisia 10^{-4} , Luffa 10^{-4} und Spongia 10^{-6} wurden kürzlich mithilfe von Tröpfchenverdampfung und statistischer Analyse aufgezeigt. Die Proben wurden gemäß den Regeln des Europäischen

Arzneibuchs für homöopathische Arzneimittel hergestellt und die Autoren verwendeten 0, 10 oder 100 Schüttelschläge. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede für alle untersuchten Präparate [12]. Darüber hinaus sind die Auswirkungen mechanischer Stöße (z. B. Bewegung, Stürzen) auf Proteinlösungen gut bekannt, und Maßnahmen zur Abschwächung dieser Auswirkungen wurden in einigen Studien untersucht und vorgeschlagen [13], [14]. Für die Homöopathie ist das Schütteln zusammen mit der Verdünnung jedoch ein wesentliches Mittel zur Herstellung von Heilmitteln.

Ein großes Problem bei potenzierten Lösungen in hohen Verdünnungen (C30, C200 usw.) über die Avogadro-Zahl hinaus, die die Verdünnungsgrenze (C12) festlegt, über der die ursprüngliche Substanz nicht mehr vorhanden sein kann, besteht darin, dass das Ausgangsmaterial nicht einmal in geringsten Mengen zu erwarten ist [15]. Dennoch haben Chikramane et al. [10] in einer Studie über aus Metallen gewonnenen Medikamenten das Vorhandensein der Ausgangsmaterialien in Form von Nanopartikeln in extremen Verdünnungen von C30 und C200 mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Elektronenbeugung und induktiv gekoppelter Plasma-Atomemissionsspektroskopie (ICP-AES) nachgewiesen. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Techniken zur Charakterisierung homöopathisch hergestellter Heilmittel verwendet, die die Existenz spezifischer Strukturen selbst in stark verdünnten Arzneimitteln hervorhoben [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24]. In der wissenschaftlichen Gemeinschaft ist jedoch allgemein bekannt, dass das Benveniste-Experiment [25] kurz nach der Veröffentlichung seiner Ergebnisse von einem wissenschaftlichen Komitee, das von der Zeitschrift Nature in das Labor des Autors geschickt wurde, als falsch widerlegt wurde, wie George Vithoulkas in seinem Artikel „Die Kontroverse über das Gedächtnis des Wassers“ [26] erklärt.

Wasser ist ein spezielles Lösungsmittel, das in biologischen und chemischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt [27]. Daher war das Verständnis der anomalen Eigenschaften von flüssigem Wasser von ständigem Interesse, und es wurden viele experimentelle und theoretische Studien durchgeführt, um seine Struktur zu verstehen [28], [29]. Dennoch sind die Struktur und Dynamik des Wassers weiterhin Gegenstand anhaltender Debatten [30]. Die Empfindlichkeit des OH-Streckschwingungsmodus gegenüber unterschiedlichen lokalen Umgebungen ermöglicht den Einsatz der Schwingungsspektroskopie bei der Untersuchung der Struktur und Dynamik von flüssigem Wasser [28]. Die Untersuchung von flüssigem Wasser mittels Infrarot- und Raman-Spektroskopie zeigt breite Spitzen im OH-Streckschwingungsbereich, was auf mehrere, zugrunde liegende Beiträge (von verschiedenen Arten, die durch unterschiedliche lokale Wasserstoffbrückenordnungen hervorgerufen werden) hindeutet, während in den Spektren von Eis deutlich unterschiedliche Spitzen zu erkennen sind [31]. Im Jahr 2009 analysierte Sun [32] flüssiges Wasser unter Umgebungsbedingungen mittels Raman-Spektroskopie und schlug die Dekonvolution des OH-Streckschwingungsbereichs in fünf Unterbänder vor. Aufgrund der Komplexität von Wasser und der hohen Verdünnung der untersuchten Lösungen ist eine derartige Analyse jedoch eine sehr schwierige Aufgabe. Um diese Schwierigkeiten zu lösen, wurden chemometrische Techniken und in jüngerer Zeit auch Modelle des maschinellen Lernens (ML) auf Raman-Signale zur Analyse und zum Datenlernen angewendet [33].

ML-Algorithmen erfreuen sich derzeit zunehmender Beliebtheit bei Klassifizierungsanwendungen [34], [35]. In jüngster Zeit wurden traditionelle und Deep-Learning-Algorithmen erfolgreich eingesetzt, um die Raman-Spektren verschiedener komplexer Materialien (z. B. Mineralien) zu unterscheiden oder hochdimensionale spektroskopische Daten zu klassifizieren [36], [37], [38].

Deep Learning (DL) ist ein Teilgebiet des ML, das wesentlich robuster ist als früher verwendete auf Feature Engineering basierende Methoden. DL-Ansätze haben viele Vorteile, darunter Zeiteffizienz, die Nicht-Erforderlichkeit von Feature-Konstruktion und bessere Ergebnisse. Künstliche neuronale Netzwerke, oft als ANNs bezeichnet, sind die Vorläufer der DL-Techniken. ANNs bestehen aus einer Eingabeebene, einer oder mehreren mittleren Ebenen (Schichten) und einer Ausgabebene. Diese Ansätze werden oft durch überwachtetes Lernen trainiert, was bedeutet, dass im Trainingsprozess vordefinierte Bezeichnungen für einen Datensatz verwendet werden. Das Convolutional Neural Network (CNN) [39], eines der repräsentativsten DL-Netzwerke, ist eine Art Vorwärts-Feedback-Neuralnetzwerk, das Convolutional-Operationen und eine sehr große Anzahl von Filtern verwendet. Es gibt viele verschiedene Arten von Convolutional-basierten Lernalgorithmen, die je nach gewünschter Aufgabe verwendet werden können. Typischerweise werden 2-D-CNN-Modelle für bildgesteuerte Anwendungen verwendet. Die Gated Recurrent Unit (GRU) [40], [41] und 1-D-CNN-Modelle werden verwendet, um zeitreihenbasierte Vorhersage- oder Klassifizierungsaufgaben zu bewältigen. Die Hauptmotivation besteht darin, dass rekurrende Modelle die potenzielle Fähigkeit haben, langfristige Beziehungen zwischen Sequenzdaten aufrechtzuerhalten. Diese Ansätze bieten eine erhebliche Hilfe bei der Lösung des Problems des verschwindenden Gradienten [42].

Die vorliegende Arbeit untersucht die strukturelle Organisation von potenzierten ethanol- und wasserbasierten Lösungen von Gold, einem homöopathischen Heilmittel namens Aurum metallicum (AUR). Drei stark verdünnte (C6, C30 und C200) AUR-Lösungen wurden in zwei unabhängigen Laboren in Rumänien und der Türkei einer TEM-Analyse unterzogen. Unterschiedliche Organisationen dieser Lösungen wurden von beiden Laboren bestätigt. Die Wahl dieser Centesimalverdünnungen ergab sich aus der Notwendigkeit, Lösungen mit geringen Mengen der Ausgangssubstanz zu untersuchen, sogar über die Avogadro-Zahl hinaus (d. h. die letzten beiden Verdünnungen wurden untersucht). Raman-Spektren wurden auch für verschiedene potenzierte wasserbasierte Lösungen (gereinigtes Wasser (PW), ungereinigtes Wasser (UW) und PW-basierte Goldlösung (AUR)) angefertigt und mit DL-Algorithmen verarbeitet, um die Fähigkeit der GRU-Modelle zu untersuchen, zwischen all diesen Lösungen zu unterscheiden und die Proben innerhalb der untersuchten Kategorien (AUR, PW und UW) oder innerhalb der drei Potenzierungsstufen (C6, C30 und C200) zu klassifizieren. DL wurde verwendet, um seine Effizienz zur Klassifizierung von Raman-Spektren zu bewerten. Raman-Spektralwerte werden als Zeitreihenwerte angenommen; Daher haben wir ein rekurrentes neuronales Netzwerk angewendet. Wir haben Experimente mit dem GRU-Modell durchgeführt, da es sowohl das Problem des verschwindenden Gradienten als auch das Geschwindigkeitsproblem löst. So haben wir die Eignung dieses Klassifizierungsansatzes in Kombination mit Raman-Spektroskopie zur Analyse von wasserbasierten Lösungen getestet, die nach der Potenzierung erhalten wurden. Mit unseren Ergebnissen konnten wir beweisen, dass diese Reihe von Methoden (TEM-EDX und Raman-Spektroskopie in Kombination mit DL) erfolgreich zur Charakterisierung und Differenzierung stark verdünnter Lösungen eingesetzt werden kann, die nach der Potenzierungsbehandlung entstehen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Alle untersuchten Lösungen wurden von der Firma Korres (Athen, Griechenland) hergestellt, einem von der Nationalen Arzneimittelagentur (EOF - Griechenland) zertifizierten Unternehmen. Diese Lösungen wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Homöopathischen Arzneibuch (HAB) unter Einhaltung der Richtlinien der Guten

Herstellungspraxis (GMP) [43] und unter Berücksichtigung der Verfahren des Europäischen Arzneibuchs für Konformitätsprüfungen hergestellt, mit einigen klar angegebenen Ausnahmen. Insbesondere beziehen sich die Ausnahmen auf die im letzten Schritt des Herstellungsprozesses verwendeten Lösungsmittel: 50 % v/v Ethanol für ethanolbasierte Lösungen und gereinigtes Wasser für wasserbasierte Lösungen. Die Lösungen wurden basierend auf dem Ausgangsmaterial in drei Gruppen kategorisiert: gereinigtes Wasser (PW), ungereinigtes Wasser (UW) und Aurum metallicum (AUR). Für jede Kategorie wurden drei Potenzstufen (C6, C30 und C200) hergestellt, wobei drei Chargen jeder Potenzstufe an verschiedenen Tagen hergestellt wurden. Die Bezeichnung C steht im Zusammenhang mit der Centesimalverdünnung und bedeutet 1 Teil der konzentrierten Lösung/vorher potenzierten Lösung auf 99 Teile Eluent (Masse/Masse).

Für die PW- und UW-Proben bestand das Ziel darin, potenzierte Lösungen herzustellen, die in jeder Hinsicht mit medizinischen Lösungen vergleichbar sind, mit Ausnahme des Fehlens eines aktiven medizinischen Inhaltsstoffs. PW (Konformität gemäß dem Europäischen Arzneibuch – Ph. Eur.) wird im Allgemeinen zur Herstellung homöopathischer Mittel verwendet, während UW teilweise gereinigt ist. Die in dieser Studie verwendeten Wasserarten hatten laut Angaben der Firma Korres folgende Eigenschaften: PW – Leitfähigkeit 0,7–0,88 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 6,4–6,8, $\text{NO}_3^- < 0,2$ ppm und Metallionen, Al $< 3\text{--}5$ ppb, As $< 0,005$ ppm, Pb 0,00032 ppm, Cd $< 0,001$ ppm, Hg $< 0,0005$ ppm (Gesamtschwermetalle 0,00682 ppm, Grenzwert $< 0,1$ ppm); UW – Leitfähigkeit 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. Als Ausgangsmaterial wurden also das gemäß Ph. Eur. gereinigte Wasser bzw. das ungereinigte Wasser verwendet. Das gereinigte Wasser des Ph. Eur. wurde auch im Verdünnungsprozess und aufgrund der spezifischen Versuchszwecke in den Herstellungsprozessen der 30C- und 200C-PW- und UW-Lösungen verwendet.

Für die Kategorie AUR wurde zunächst bis zur 4C-Stufe eine Methode verwendet, die auf der Verreibung von Aurum metallicum mit Lactosemonohydrat als Vehikel basiert. Um dann die 6C-Flüssigpotenz zu erhalten, verwendete das Protokoll gereinigtes Wasser (Konformität gemäß Ph. Eur.) zur Herstellung der 5C-Potenz und Ethanol 30 % (m/m) zur Herstellung der 6C-Flüssigverdünnung. Ab 6C und bis 29C und dementsprechend bis C199 wurde das gereinigte Wasser des Ph. Eur. im Herstellungsprozess verwendet. Die endgültigen potenzierten Lösungen von 30C und 200C wurden mit Ethanol 50 % (v/v) für ethanolbasierte AUR-Lösungen hergestellt. Aufgrund der spezifischen Versuchszwecke wurde das gereinigte Wasser des Ph. Eur. für die Herstellung der 6C-Flüssigpotenz verwendet. Bei der Herstellung der wasserbasierten AUR-Lösungen 30C und 200C wurde gereinigtes Wasser verwendet.

2.1.1. Transmissionselektronenmikroskopie

Für die TEM-Studien wurden zwei Arten von AUR-Proben verwendet; die erste Art, AUR, hergestellt in einer 50 %igen v/v Ethanolösung, wurde in Rumänien analysiert und als E-AUR bezeichnet, während die zweite Art von AUR nur in gereinigtem Wasser (PW) hergestellt und in der Türkei analysiert wurde (als W-AUR bezeichnet). Für beide Arten von AUR wurden drei potenzierte Proben untersucht, nämlich 6C, 30C und 200C.

2.1.2. Raman-Untersuchungen

Für die Raman-Untersuchungen wurden drei Arten von Lösungen verwendet: gereinigtes Wasser (PW), ungereinigtes Wasser (UW) und AUR. Zusätzlich berücksichtigten wir für die PW- und UW-Gruppen nicht potenzierte Proben (Referenzproben der für den Potenzierungsprozess verwendeten Wasserarten) und drei Arten von potenzierten Wasserproben (6 C, 30C und 200C); für jede Art von potenzierten Wasserproben wurden an

drei verschiedenen Tagen drei Chargen hergestellt. Für die AUR-Kategorie wurden nur die wasserbasierten potenzierten Lösungen untersucht. Dies bedeutet, dass insgesamt 12 Proben für PW, 12 Proben für UW und 9 Proben für AUR berücksichtigt wurden.

2.2. Methoden

2.2.1. Rumänische TEM- und EDX-Verfahren

Die strukturelle und morphologische Charakterisierung der AUR-Proben erfolgte mit einem Hitachi HD-2700 Rastertransmissionselektronenmikroskop (STEM), das mit einem Sekundärelektronendetektor (SE), einem Transmissionselektronendetektor (TE) (Hitachi High Tech., Japan) und einer Kaltfeldemissionskanone für hochauflösende (HRTEM) Bildgebung mit einer Auflösung von 0,144 nm ausgestattet war. Kohlenstoffbeschichtete TEM-Gitter wurden mit 6 µl der potenzierten AUR-Lösungen behandelt, die zuvor 10 Mal zur Homogenisierung verschüttelt wurden. Nach 1–2 Minuten wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Whatman-Filterpapier der Güteklasse 1 abgetupft und die Gitter an der Luft trocknen gelassen. Die Proben wurden mit dem STEM-System analysiert, das mit 200 kV betrieben wurde. Für die EDX-Untersuchungen wurde ein duales EDX-System bestehend aus einem X-Max N100TLE Siliziumdriftdetektor (SDD) (Oxford Instruments) verwendet.

2.2.2. Türkische TEM- und EDX-Verfahren

TEM-Bilder der drei Potenzen (6C, 30C und 200C) von AUR wurden mit einem Hitachi HT 7800 TEM aufgenommen, das mit einer Beschleunigungsspannung von 100 kV betrieben wurde. Nachdem jede Probe 10-mal geschüttelt worden war, wurde 1 Tropfen auf ein kohlenstoffbeschichtetes Gitter getropft und in einer sauberen Umgebung trocknen gelassen. Die EDX-Analyse der Proben wurde mit einem Oxford Instruments X-MaxN durchgeführt, das an dasselbe TEM-Gerät angeschlossen war, um das Vorhandensein von Gold zu bestätigen.

Die Histogramme, die sowohl für die rumänischen als auch die türkischen TEM-Bilder erstellt wurden, wurden auf der Grundlage von Daten erstellt, die mit der Software ImageJ (NIH, USA) erhalten wurden.

2.2.3. Raman-Spektroskopie

Raman-Spektren wurden auf einem NRS-3300 Raman-Spektrometer (Jasco, Japan) aufgezeichnet, das mit einem CCD-Detektor (Charge-Coupled Device) ausgestattet war und eine 514,5 nm-Laseranregung (grünes Licht) verwendete. Die Lösungen wurden in Glaskapillarröhrchen (Marienfeld, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,5–1,6 mm analysiert. Ein Olympus UMPLFL 20X-Objektiv, 600 l/mm-Gitter, 0,1 × 6 mm Schlitz, eine Belichtungszeit von 120 s und drei Scans wurden verwendet, um die Raman-Spektren von ungefähr 72 cm⁻¹ bis 4020 cm⁻¹ aufzuzeichnen. Der 521 cm⁻¹-Peak, der Si entspricht, wurde verwendet, um das Spektrometer zu kalibrieren. Rohe und verrauschte Daten wurden nicht entrauscht oder geglättet, und Ausreißer wurden nicht aus dem Datensatz entfernt. Die Vorverarbeitung der Daten umfasste zwei Hauptschritte und wurde mit Spectra Manager (JASCO) und OriginPro 2023 (OriginLab Corporation) durchgeführt. Im ersten Schritt der Datenvorbehandlung wurde ein Wellenzahlintervall von 180 bis 4000 cm⁻¹ gewählt und die Anzahl der Merkmale durch Anwendung einer Spline-Methode 3. Ordnung mit einem Datenabstand von 0,3 auf unter 13.000 begrenzt. Diese Daten wurden weiter auf [0,1] normalisiert und für die DL-Untersuchung als unvorbehandelte Raman-Daten berücksichtigt. Der zweite Schritt umfasste einen Basisliniensubtraktionsprozess (bg), der in OriginPro auf die vor der Normalisierung im ersten Schritt erhaltenen Daten angewendet wurde. Um den bg-Prozess anzuwenden, wurden die folgenden Schritte ausgeführt: benutzerdefinierter Basislinienmodus, die Methode der 2. Ableitung (Nullen) zur Ankerpunkterkennung,

Einrasten am Spektrum, die Linieninterpolationsmethode und dieselbe Anzahl von Basislinienpunkten wie Eingabedaten [44]. Die erhaltenen Daten wurden weiter auf [0,1] normalisiert, bevor sie zum Erstellen der bg-vorbehandelten Datensätze für die DL-Studie verwendet wurden.

2.2.4. Deep Learning

DL-Untersuchungen wurden mit der Programmiersprache Python und Colab Pro durchgeführt, das eine beschleunigte Computerumgebung bietet. Das GRU-Modell wurde mit der Bibliothek Keras 2.12.0 erstellt und trainiert. Die Colab Tesla T4 GPU wurde zum Trainieren des Modells mit einer großen Batchgröße verwendet. Der Tesla T4 verfügt über insgesamt 2560 CUDA-Kerne sowie 3,7 Rechenleistung, 15 GB Speicher und GDDR6 VRAM. Zusätzlich wurde das Paket Sklearn 1.2.2 verwendet, um die erhaltenen Ergebnisse zu analysieren und zu erklären. Weitere Einzelheiten zum Protokoll für DL-Untersuchungen finden Sie in der Datei mit ergänzendem Material und in den Abbildungen S1 und S2.

3. Ergebnisse

Um die Eignung unserer vorgeschlagenen Methode zur Charakterisierung verschiedener Lösungen und Konzentrationen zu ermitteln, wollten wir zunächst die Eigenschaften der Proben durch TEM-Analyse bestimmen.

3.1. TEM-Untersuchung

TEM ist ein wertvolles Werkzeug, das grundlegende Daten über die Organisation von Nanomaterialien liefert; dieses Wissen ist sehr wichtig für das Verständnis und die Entwicklung in der Materialwissenschaft sowie für Bereiche, in denen stark verdünnte Lösungen verwendet werden, die ebenfalls aus Nanostrukturen bestehen.

3.1.1. Aurum metallicum 6C

Abb. 1 zeigt mehrere TEM-Bilder, die mit zwei verschiedenen Instrumenten (siehe Abschnitt Methoden) für die 6C-Konzentration von AUR aufgenommen wurden. Für die Probenvorbereitung wurden zwei verschiedene Medien verwendet – das erste Medium war eine 50 % v/v Ethanollösung, die für die in Rumänien analysierten AUR-Proben verwendet wurde (E-AUR 6C). Das zweite Medium war gereinigtes Wasser, das für die in der Türkei untersuchten Proben verwendet wurde (W-AUR 6C).

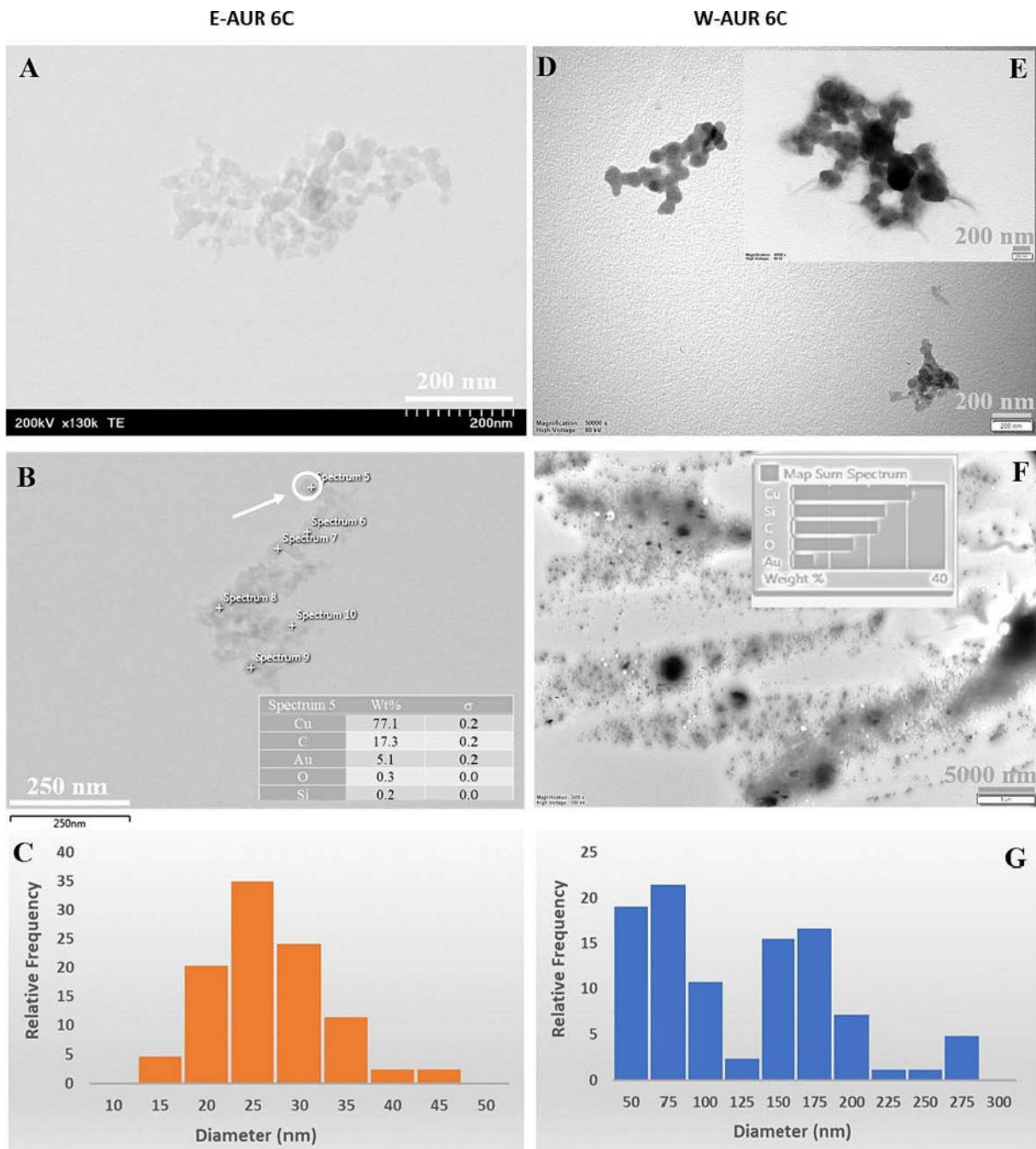


Abb. 1. TEM-Daten für die 6C-Potenz von AUR. (A-C) TEM-Bilder und Histogramm der relativen Häufigkeit von Nanopartikelgrößen für die AUR-Proben auf Ethanolbasis und (D-G) für die Proben auf Wasserbasis; Einschub – EDX-Daten für die markierten Punkte oder das Summenspektrum.

Trotz der zugrunde liegenden Unterschiede in den Lösungsmitteln sind die erhaltenen TEM-Bilder hinsichtlich der Form der Nanopartikel recht ähnlich. Die Nanopartikelgröße hängt jedoch vom Lösungsmitteltyp ab. Dies wird in den Histogrammen der beiden Proben deutlich und zeigt kleinere Nanopartikel für E-AUR 6C als für W-AUR 6C (Abb. 1C und G), höchstwahrscheinlich, weil Ethanol als Stabilisierungsmittel wirksamer ist als Wasser. Die EDX-Daten (Einschübe von Abb. 1 und Abb. S3 und S4) zeigen vergleichbare Prozentsätze von Gold (Au) in beiden Proben und das Vorhandensein von Silizium (Si) und Sauerstoff (O) (das Kupfer (Cu) stammt aus dem Gitter).

3.1.2. Aurum metallicum 30C

Darüber hinaus wurde die 30C-Wirksamkeit von AUR untersucht; Abb. 2 und Abb. S5-S8 zeigen die TEM-Bilder, EDX-Daten und TEM-EDX-Mapping-Ergebnisse für diese Wirkstärke. Hier sind die Ähnlichkeiten zwischen den beiden Proben, E-AUR 30C und W-AUR 30C, hinsichtlich der Nanostrukturform und des Auftretens von Verunreinigungen erwähnenswert.

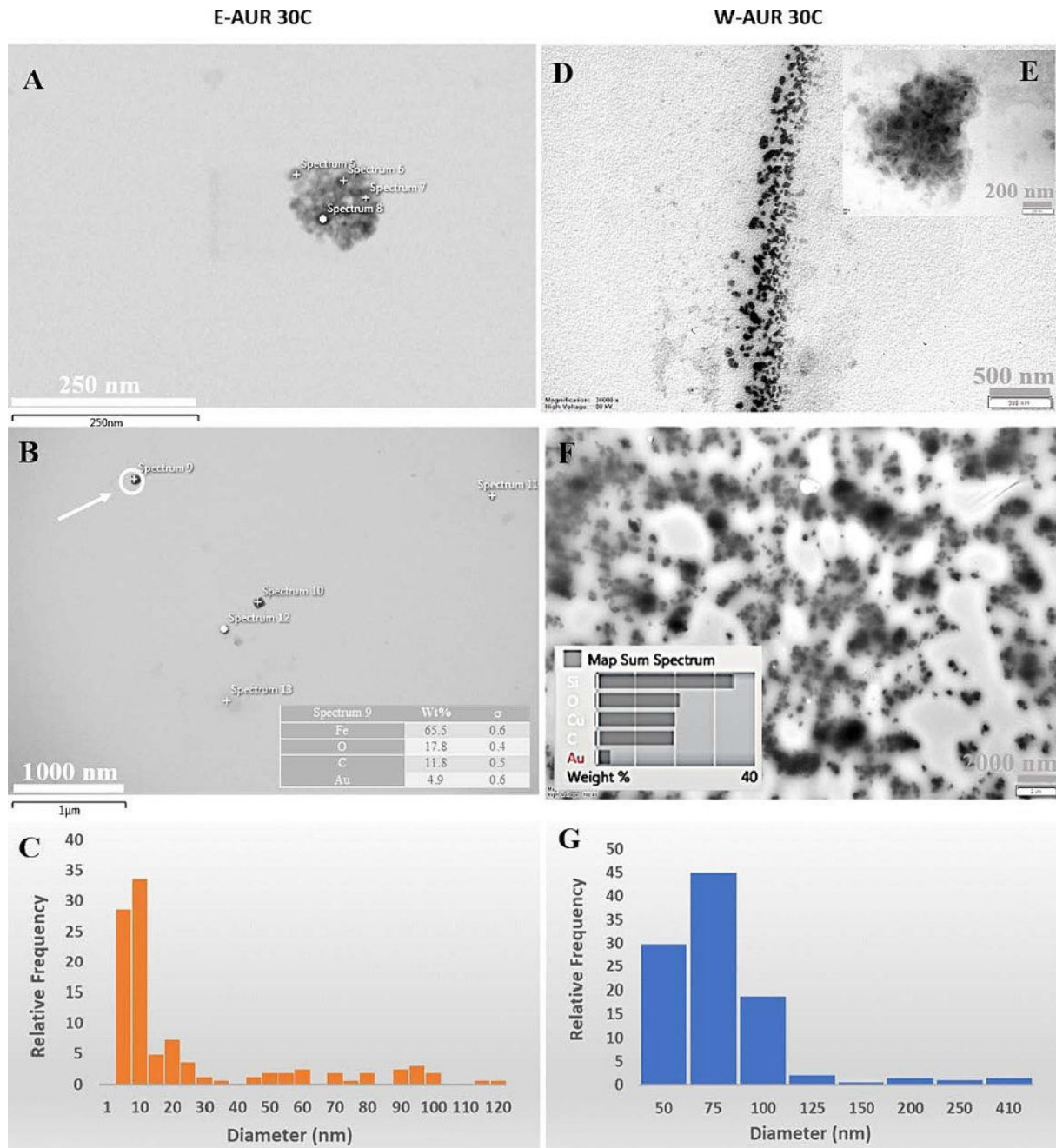


Abb. 2. TEM-Daten für die 30C-Potenz von AUR. (A-C) TEM-Bilder und Histogramm der relativen Häufigkeit von Nanopartikelgrößen für die AUR-Proben auf Ethanolbasis und (D-G) für die Proben auf Wasserbasis; Einschub – EDX-Daten für die markierten Punkte oder das Summenspektrum.

Wie im vorherigen Fall, Potenz 6C, ist die Größe der Nanopartikel/Nanostrukturen der 30C-Potenz bei E-AUR tendenziell kleiner als bei W-AUR (Abb. 2C und G); dieses Verhalten lässt sich durch die Fähigkeit von Ethanol erklären, als wirksames Stabilisierungsmittel zu wirken. Darüber hinaus weisen die Histogramme in Abb. 1 und Abb. 2 auf kleinere Nanostrukturen in E-AUR 30C als in E-AUR 6C und eine signifikante Größenabnahme von mehr als 150 nm im Vergleich zu den Proben auf Wasserbasis hin; diese großen Strukturen sind in W-AUR 6C deutlich zu erkennen, in der W-AUR 30C-Probe sind sie jedoch nur in Spuren sichtbar. Diese signifikante Änderung zwischen den Profilen der beiden Potenzen, 6C und 30C, tritt nach dem Potenzierungsprozess auf, der mehrere aufeinanderfolgende Verdünnungen und Verschüttelungen umfasst.

3.1.3. Aurum metallicum 200C

Die Eigenschaften der Potenz 200C sind in Abb. 3 und Abb. S9-S11 dargestellt und wurden durch Analyse von zwei Proben (E-AUR 200C – hergestellt mit wässriger 50 % v/v Ethanolösung und W-AUR 200C – nur mit gereinigtem Wasser gewonnen) ermittelt.

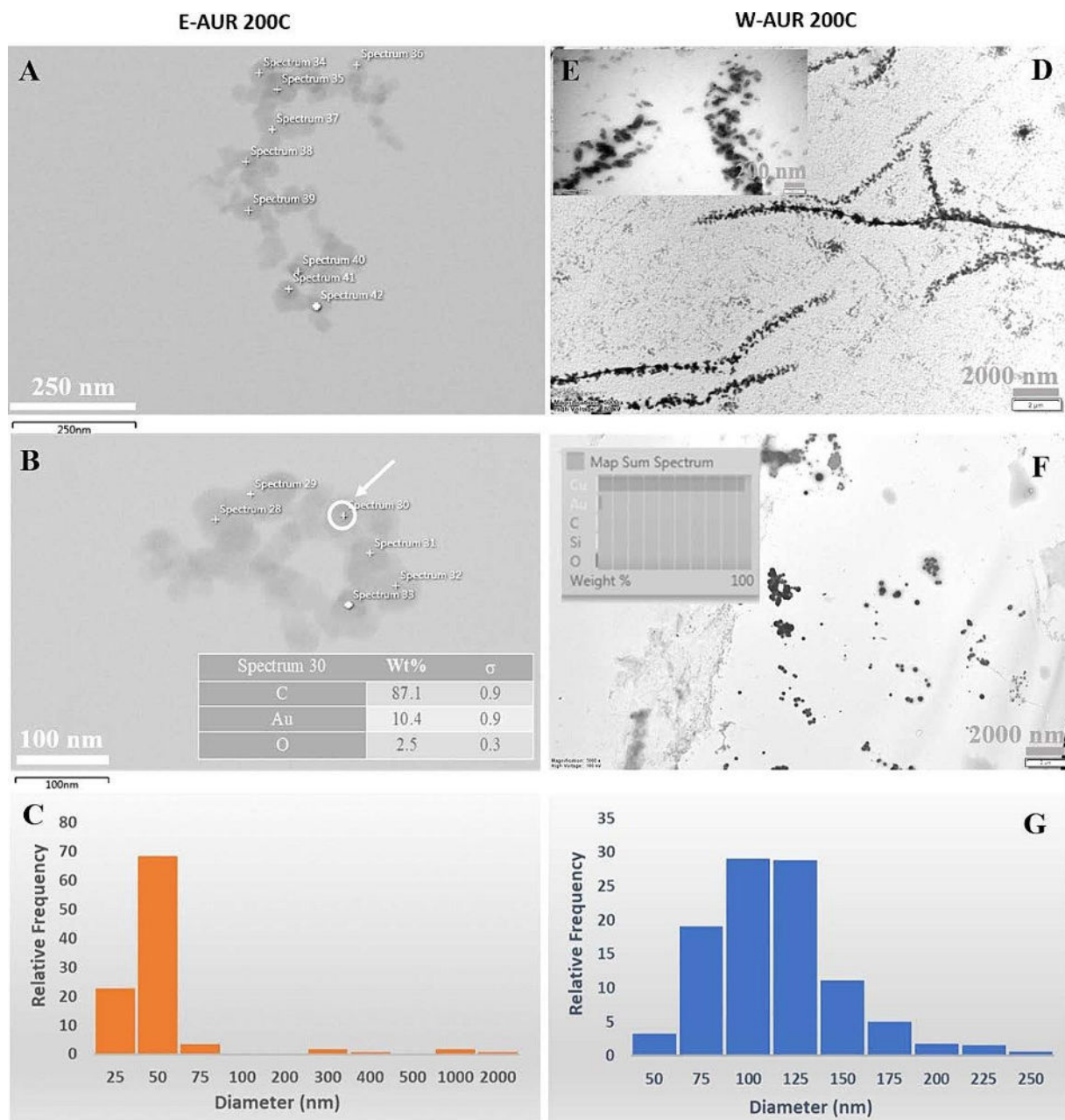


Abb. 3. TEM-Daten für die 200C-Potenz von AUR. (A-C) TEM-Bilder und Histogramm der relativen Häufigkeit von Nanopartikelgrößen für die ethanolbasierten Proben und (D-G) für die wasserbasierten Proben; Einschub – EDX-Daten für die markierten Punkte oder das Summenspektrum.

Die allgemeine Tendenz, die für die 6C- und 30C-Potenzen beobachtet wurde, ist auch hier vorhanden; genauer gesagt ist die Größe der Nanostrukturen in der E-AUR 200C-Probe kleiner als die in W-AUR 200C, wie aus den Histogrammen in Abb. 3 hervorgeht. Darüber hinaus sind die Nanopartikel bei beiden 200C-Proben größer als die bei 30C-Potenz beobachteten Nanopartikel und unterscheiden sich in Größe und Form stark von den Nanopartikeln bei 6C-Potenz (Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

In Abb. 3B sind eine deutliche Organisation und ein völliges Fehlen von Verunreinigungen in einigen AUR 200C-Clusteranordnungen erkennbar. Darüber hinaus weisen beide AUR 200C-Proben einen bevorzugten verzweigten Anordnungsmodus auf (Abb. 3A und D), und das Vorhandensein kleiner Mengen von Verunreinigungen wie Si und Fe in diesen Clustern wird durch die im Einschub von Abb. 3 und in den Abb. S9 und S11B dargestellten EDX-Daten belegt.

3.2. Raman-Spektroskopie und Deep-Learning-Untersuchungen

Nach Durchführung der TEM-Studien kann eine schnelle und zerstörungsfreie Technik wie die Raman-Spektroskopie zur Analyse der untersuchten Lösungen in Betracht gezogen werden. Aufgrund der größeren Anordnungen, die im TEM für die wasserbasierten Proben beobachtet wurden, und unter Berücksichtigung der Raman-Besonderheiten von Wasser-Ethanol-Lösungen wurde die Raman-Spektroskopie nur auf die wasserbasierten Lösungen angewendet. Ziel war es, die Transformationen zu untersuchen, die in drei Gruppen/Kategorien auftreten: PW, UW und AUR. PW wird im Allgemeinen zur Herstellung homöopathischer Heilmittel verwendet, während UW eine teilweise gereinigte Form von Wasser ist; diese Wasserarten besitzen unterschiedliche Eigenschaften. Hier stellen wir die niedrige Leitfähigkeit der PW-Proben ($0,7\text{--}0,88\ \mu\text{S}/\text{cm}$) und ihre niedrigen Ionenwerte ($\text{NO}_3^- < 0,2\ \text{ppm}$, $\text{Al} < 3\text{--}5\ \text{ppb}$, Gesamtschwermetalle $0,00682\ \text{ppm}$) fest; außerdem haben die UW-Proben eine höhere Leitfähigkeit ($196\ \mu\text{S}/\text{cm}$) sowie höhere Konzentrationen verschiedener Ionen (Nitrat, Bicarbonat, Natrium usw.). Weitere Einzelheiten finden Sie im Abschnitt „Material und Methoden“.

Die Potenzierung wurde auf PW-, UW- und AUR-Proben angewendet, die an drei verschiedenen Tagen hergestellt wurden, um drei Chargen potenziert Proben mit Potenzen von 6C, 30C und 200C zu erhalten. PW und UW werden im Allgemeinen nicht für die Vermarktung potenziert; das Potenzierungsverfahren wurde nur für diese Studie auf sie angewendet. Somit wurden 33 Proben mittels Raman-Spektroskopie analysiert. Jede Probe wurde an 5 Punkten analysiert, um repräsentative Daten der untersuchten Lösungen zu erhalten. Insgesamt wurden 165 Raman-Spektren (Bereich $180\text{--}4000\ \text{cm}^{-1}$) der Klassifizierungsstudie unterzogen. Die während dieses Experiments erhaltenen rohen und bg-vorbehandelten Raman-Spektren für verschiedene Potenzierungsstufen (6C, 30C und 200C) der untersuchten Probentypen (PW, UW und AUR) sind in den Abb. S12–S17 dargestellt.

3.2.1. Klassifizierung aller Klassen mit Deep Learning unter Verwendung des GRU-Modells
Die Raman-Spektralklassifizierungsergebnisse für die 11 verschiedenen Klassen, die mit dem trainierten GRU-Modell erhalten wurden, sind in Abb. 4 dargestellt; sowohl unvorbehandelte als auch bg-vorbehandelte Datensätze wurden berücksichtigt.

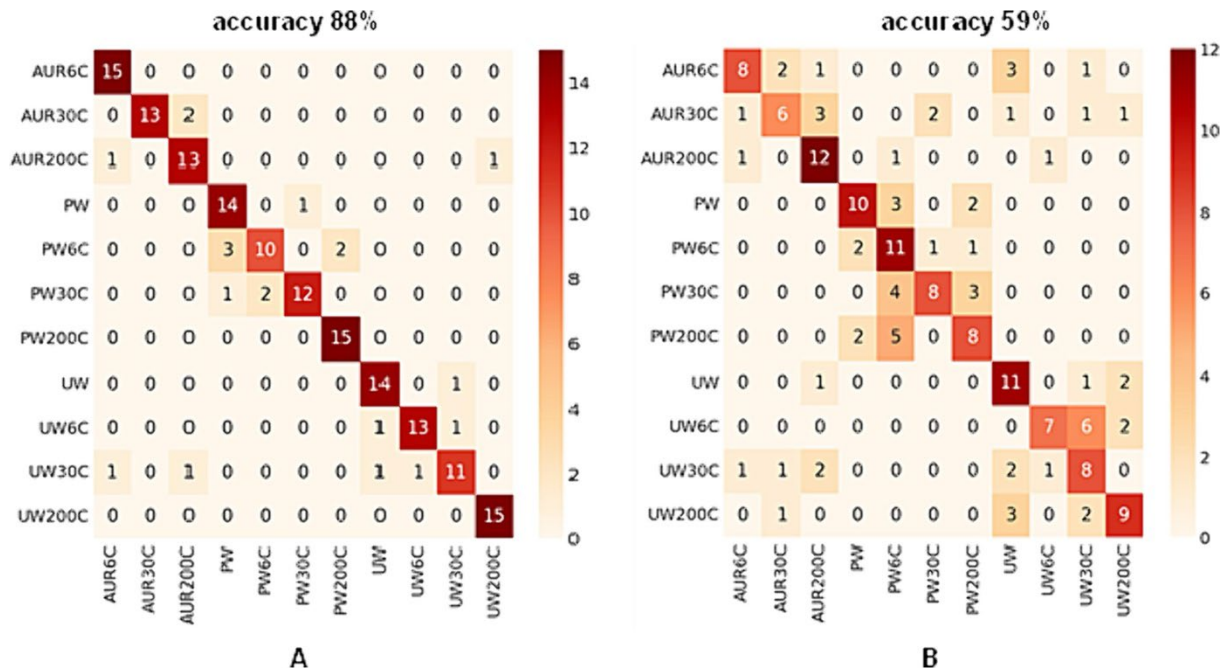


Abb. 4. Konfusionsmatrix des GRU-Modells für (A) unvorbehandelte und (B) bg-vorbehandelte Daten aller untersuchten Kategorien.

Die Konfusionsmatrix wird angezeigt, um eine Zusammenfassung der Anzahl der Fälle zu liefern, in denen das GRU-Modell das Ergebnis richtig oder falsch vorhergesagt hat. Das Modell weist eine sehr gute Erkennungskapazität beim Vergleich der drei untersuchten Kategorien auf; es zeigt somit eine hohe Effizienz bei der Unterscheidung zwischen den Kategorien AUR, PW und UW, wenn unvorbehandelte Raman-Daten berücksichtigt werden (Abb. 4A). In diesem Fall kann eine Genauigkeit von 88 % (Tabelle 1) festgestellt werden; dieser Wert kann als sehr gut angesehen werden, insbesondere wenn die großen Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Klassen berücksichtigt werden. Dieser Wert, der etwas unter 90 % liegt, ist größtenteils das Ergebnis falscher Zuordnungen, die für unterschiedliche Potenzierungsstufen oder Referenzproben derselben Kategorie generiert wurden; Es wurden nur 3 falsche Zuordnungen zwischen den drei untersuchten Klassen - AUR, PW, UW - registriert (eine Probe von AUR200C wurde UW200C zugeordnet und zwei Proben von UW30C wurden AUR6C bzw. AUR200C zugeordnet).

Tabelle 1. Klassifizierungsergebnisse, die mit unvorbehandelten und baseline-subtrahierten (bg-vorbehandelten) Raman-Daten erzielt wurden.

	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
	Accuracy: 88 %			Accuracy: 59 %			Accuracy: 61 %			Accuracy: 35 %		

Somit waren die anderen drei falschen Zuordnungen für die AUR-Kategorie auf die Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Potenzierungsstufen innerhalb der Gruppe zurückzuführen. Ein ähnliches Verhalten wurde auch innerhalb der PW- und UW-Gruppen beobachtet. Es gab keine Fehler im Zusammenhang mit der Unterscheidung von PW- von AUR- oder UW-Proben. Innerhalb der PW- und UW-Gruppen wurde für die Potenzstufe 200C eine korrekte Erkennung beobachtet, während für die anderen Potenzierungsstufen bis zu 5 Proben falsch zugeordnet wurden (dieses Maximum wurde in der Klasse PW6C erreicht).

Als das GRU-Modell jedoch auf den mit bg vorbehandelten Datensatz angewendet wurde, zeigten die Ergebnisse eine Genauigkeit von nur 59 % (Abb. 4B und Tabelle 1). Innerhalb der drei untersuchten Gruppen wurden erhebliche falsche Klassifizierungsergebnisse erhalten, es gab jedoch auch einige falsche Zuordnungen zu Proben außerhalb der richtigen Gruppe. Diese Ergebnisse zeigen, dass die schlechte Erkennungskapazität des Modells auf den Informationsverlust zurückzuführen ist, der auftrat, als die Hintergrundsubtraktion auf die Raman-Daten angewendet wurde. Die AUR- und UW-Gruppen scheinen am stärksten betroffen zu sein (Abb. 4B).

Tabelle 1 enthält eine eingehende Analyse der Leistungswerte des vorgeschlagenen Ansatzes. Die Präzisions-, Rückruf- und f1-Werte für jede Klasse wurden unabhängig voneinander

ermittelt. Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die Makro-f1-Werte für die beiden Datensätze 0,88 und 0,59 betragen. Insbesondere weisen die Kategorien PW, PW6C, PW30C und PW200C in beiden Datensätzen stabile Erkennungsraten auf. Wenn Rückrufwerte berücksichtigt werden, neigt das Modell dazu, die Klassifizierungsgenauigkeit von UW30C-Proben zu unterschätzen. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Unterscheidungskraft dieses Modells für die UW-Daten insgesamt etwas eingeschränkt ist. Darüber hinaus untersucht diese Arbeit die Verwendung eines bekannten maschinellen Lernansatzes, insbesondere von Support Vector Machines (SVM), zur Kategorisierung von Raman-Daten. Verglichen mit der Deep-Learning-Methode (GRU) lieferte die traditionelle maschinelle Lerntechnik (SVM) die niedrigsten Genauigkeitswerte für die beiden Datensätze.

Angesichts dieser Ergebnisse wurde eine eingehendere Untersuchung durchgeführt, bei der ein intelligenter Datenerweiterungsansatz eingesetzt wurde, um die Größe des Datensatzes zu erhöhen. Mithilfe einer spektralen Segmentierungsstrategie wurde jedes Raman-Spektrum in kleinere Segmente unterteilt. Die Abmessungen des Segments betragen 1×1024 . Wenn beispielsweise die Stichprobengröße auf 1×12733 festgelegt wird, werden insgesamt etwa 12 einzigartige Segmente erfasst. Der ursprüngliche Datensatz enthält 15 Instanzen für eine bestimmte Klasse. Nach Abschluss des Segmentierungsverfahrens wird die Größe des Datensatzes auf 1980×1024 geändert und besteht aus 11 unterschiedlichen Klassen. Somit beträgt die Größe der Stichproben pro Klasse 180. Der Datensatz wird dann partitioniert, wobei 80 % für das Training vorgesehen sind und der verbleibende Teil für Testzwecke reserviert ist. Die fünffache Kreuzvalidierung wurde angewendet, um die Leistung unseres GRU-Modells anhand der erhaltenen Segmentierungsdatensätze zu messen. Nach diesem Ansatz wurde festgestellt, dass es eine direkte Beziehung zwischen der Vergrößerung des Segments und der Leistungsabnahme gibt. Die in Abb. S18 und Tabelle S1 dargestellten experimentellen Ergebnisse, die unter Einbeziehung der Proben aus den Testsätzen erzielt wurden, zeigen, dass unser GRU-Modell einen hohen Genauigkeitswert von 99,45 % für unvorbehandelte Daten und einen perfekten Genauigkeitswert von 100 % für bg-vorbehandelte Daten über 11 Klassen hinweg erreicht. Auch wenn weitere Untersuchungen, d. h. unter Einbeziehung einer größeren Anzahl von Proben, durchgeführt werden müssen, bevor die spektrale Segmentierungsstrategie als die am besten geeignete für Experimente mit einer hohen Anzahl von Klassen vorgeschlagen werden kann, kann diese Strategie als wertvoller Ansatz zur Datenerweiterung für unseren Datentyp angesehen werden.

3.2.2. Klassifizierung der Potenzen innerhalb jeder Gruppe mit Deep Learning unter Verwendung des GRU-Modells

Die mit der DL-Methode innerhalb jeder Kategorie (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) und (UW, UW 6C, UW 30C, UW 200C) erzielte Erkennungsrate wurde unter Einbeziehung unvorbehandelter und bg-vorbehandelter Raman-Daten analysiert und die Ergebnisse hinsichtlich der Leistungswerte verglichen. Abb. 5 veranschaulicht die Ergebnisse der Experimente nach Anwendung einer stratifizierten 15-fachen Kreuzvalidierung (CV).

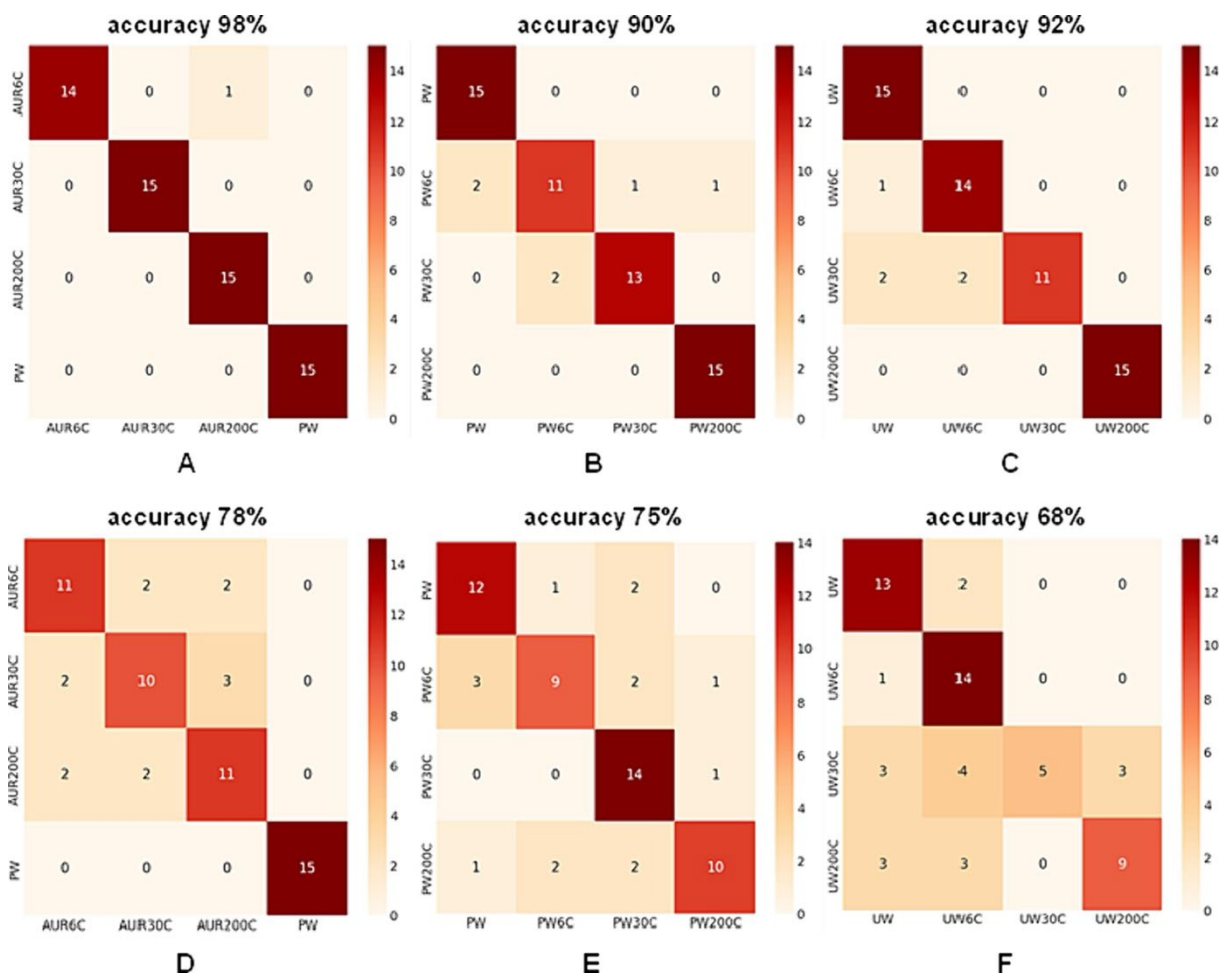


Abb. 5. Leistung des Deep-Learning-Modells zur Bewertung der Unterscheidung innerhalb jeder Gruppe unter Verwendung von (A-B-C) unvorbehandelten und (D-E-F) bg-vorbehandelten Daten.

Um Proben für Validierungs- und Trainingszwecke zuzuweisen, verwendeten wir eine 15-fache Aufteilungstechnik, bei der 11 Proben zur Validierung ausgewählt und die verbleibenden Proben zum Training bestimmt wurden. Für die AUR-Gruppe wurde die nicht potenzierte PW-Klasse als Referenz verwendet.

Im Fall von AUR vs. PW zeigen die erstellten Konfusionsmatrizen, dass Genauigkeiten von 98 % und 78 % erreicht wurden, Abb. 5A,D. Die Ergebnisse zeigten Genauigkeiten von 90 und 75 % für die PW-Gruppe, Abb. 5B,E, während Genauigkeitswerte von 92 % und 68 % für die UW-Gruppe erreicht wurden, Abb. 5C,F. Im Allgemeinen weisen die Gruppen PW6C und UW30C im Vergleich zu den anderen Klassen eine geringe Leistung auf. Nach einer allgemeinen Analyse ist klar, dass die AUR-Gruppe die wenigsten Fälle falscher Klassifizierungen aufweist und dass die meisten Fehlklassifizierungen aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen den Klassen 6C und 30C auftreten.

3.2.3. Klassifizierung innerhalb desselben Potenzierungsniveaus mit Deep Learning unter Verwendung des GRU-Modells

Zusätzlich wurde die Leistung von DL bei der Unterscheidung von Klassen innerhalb desselben Potenzierungsniveaus basierend auf ihren Raman-Spektren analysiert (Abb. 6). Bei der Kategorisierung der Potenzierungsniveaus haben wir fünf Klassen berücksichtigt, darunter die potenzierten AUR-, PW- und UW-Proben und die nicht potenzierten PW- und UW-

Proben als Referenzen. Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass für die Potenz 6C Genauigkeitswerte von 99 % (unvorbehandelt) und 84 % (bg-vorbehandelt) aus dem GRU-Modell erzielt wurden. Genauigkeitswerte von 95 % (unvorbehandelt) und 83 % (bg-vorbehandelt) wurden auch für die Potenz 30C gefunden. Für die Potenz 200C lieferte das GRU-Modell Genauigkeitswerte von 96 % (unvorbehandelt) und 77 % (bg-vorbehandelt). Somit wurde die beste Leistung des GRU-Modells bei Lösungen mit niedriger Verdünnung (6C) beobachtet.

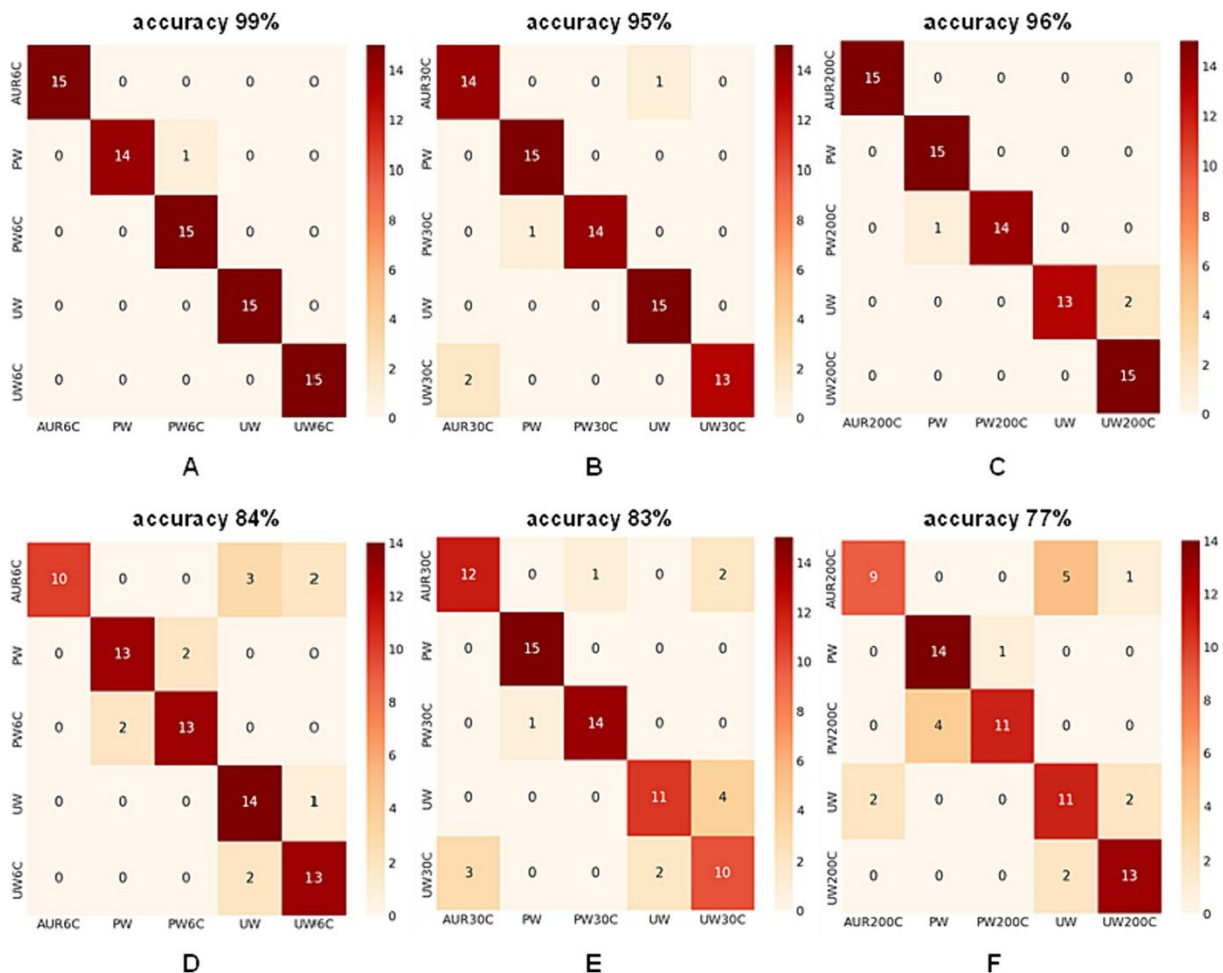


Abb. 6. Leistung des Deep-Learning-Modells zur Bewertung der Unterscheidung innerhalb jeder Potenzierungsstufe unter Verwendung von (A-B-C) unvorbehandelten und (D-E-F) bg-vorbehandelten Daten.

4. Diskussion

Die Notwendigkeit, zuverlässige Techniken zur effizienten Charakterisierung ultrahoher Verdünnungen zu finden, ist bekannt. In dieser Studie zeigen wir, dass es möglich ist, eine Reihe von Methoden (TEM-EDX und Raman-Spektroskopie in Kombination mit DL) zur erfolgreichen Charakterisierung und Unterscheidung hochverdünnter Lösungen zu verwenden, die nach der Potenzierungsbehandlung erhalten werden. TEM-EDX kann zur Bewertung der Zusammensetzung und Morphologie jeder kolloidalen Lösung verwendet werden. Wir zeigen hier, dass diese Technik sogar für hochverdünnte Lösungen effizient ist und es uns ermöglicht, wertvolle Informationen zu jeder Potenzierungsstufe zu erhalten und

sie auf diese Weise zu unterscheiden, indem ein Bild erstellt wird, das jeder Potenzierungsstufe zugeordnet werden kann.

Generell scheint die Morphologie der AUR 6C-Lösung der von üblichen kolloidalen Goldnanopartikellösungen ähnlich zu sein [45]. Die Größe der Goldnanopartikel hängt von der Art der im Syntheseprozess verwendeten Rohstoffe ab. Bei den beiden anderen Potenzen von AUR, 30C und 200C, scheint ihr Design dem Konstruktionsgesetz zu unterliegen, das die strategische Entwicklung neuartiger Architekturen auf der Grundlage eines physikalischen Gesetzes vorhersagt [46].

Si und O sind die beiden Elemente, die in den AUR 30C-Proben allgegenwärtig sind, während isolierte Nanopartikel mit Verunreinigungen wie Eisen (Fe), Titan (Ti), Kalzium (Ca), Magnesium (Mg) und Aluminium (Al) in der E-AUR 30C-Probe sichtbar sind, deren Bestandteile kleiner sind (Abb. 2 und Abb. S5-S7). Diese Verunreinigungen stammen entweder aus dem verwendeten Lösungsmittel oder könnten während der Potenzierungsbehandlung durch Auflösung aus den Glasfläschchen entstehen (z. B. Si oder Ti). Der Grund, warum diese Verunreinigungen in der Potenz 30C so deutlich sind, kann auf die Größe der Bestandteile des Heilmittels zurückgeführt werden, die kleiner sind als die Bestandteile der beiden anderen Potenzen (6C und 200C), wie in den Histogrammen von Abb. 1C und G, 2C und G und 3C und G dargestellt. Darüber hinaus müssen das in der W-AUR 30C-Probe beobachtete fadenförmige Profil (Abb. 2D), das Vorkommen einiger kohlenstoffbasierter (C) Strukturen in E-AUR 30C (Abb. S7B) und das Vorhandensein von Gold in den beiden 30C-Potenzproben (Abb. 2 Einschub und Abb. S5 und S8B) hervorgehoben werden.

All diese Beobachtungen legen eine unterschiedliche Organisation der 6C- und 30C-Potenzen von AUR nahe und weisen auf das Vorhandensein sowohl von Nanopartikeln als auch von Clusteranordnungen in den 30C-Proben hin. Somit legen die klare Nanopartikelform der Verunreinigungen und die fadenförmigen/clusterförmigen Anordnungen aus kleinen Strukturen die Annahme nahe, dass zumindest bei AUR 30C die beobachtete Organisation nicht in erster Linie mit den Nanopartikelsystemen zusammenhängt, sondern eher mit großen Anordnungen (Clustern) kleiner Strukturen. Höchstwahrscheinlich enthalten diese Cluster auch Ethanol- und Wassermoleküle (in E-AUR) oder Wassermoleküle (in W-AUR), während Verunreinigungen, entweder isoliert oder mit diesen großen Anordnungen verbunden, als Nanopartikel erscheinen (klare runde Form und unterschiedliche Größen). Obwohl in allen untersuchten Proben Gold identifiziert wurde, erscheint es in den TEM-EDX-Mapping-Bildern verstreut auf der Gitteroberfläche.

Die für die AUR 200C-Proben erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine ausgedehnte Organisation der AUR 200C-Moleküle hin, was auf die Existenz stabiler und organisierter Strukturen über einen größeren Bereich hindeutet. Die Verunreinigungen liegen als große Anordnungen vor (Abb. S10B); Daher sind in den TEM-EDX-Mapping-Ergebnissen große, miteinander verbundene Verunreinigungen (Mikrometergröße) wie Si, Al, Fe und O zu sehen. Das fadenförmige Profil ist auch bei den W-AUR 200C-Proben (Abb. 3A, 3D) zu erkennen, ebenso wie das Vorkommen einiger kohlenstoffbasierter (C) Strukturen in E-AUR 200C (Abb. S10A und S10C) und das Vorhandensein von Gold in den beiden untersuchten 200C-Probentypen (Abb. 3, Einschub und Abb. S9 und S11B).

Einige dieser Ergebnisse werden durch die Literatur gestützt; zum Beispiel wurde das Vorhandensein von Gold selbst bei hohen Potenzen (30 °C und 200 °C) von AUR, die jenseits der Avogadro-Zahl liegen, auch in den Arbeiten von Chikramane et al. [10] und Rajendran

[47] gezeigt. In der Arbeit von Chikramane et al. wurde die elementare Zusammensetzung von TEM-Partikeln durch ausgewählte Flächenelektronenbeugung (SAED) ermittelt und durch ICP-AES-Analyse bestätigt [10]. Die Studie von Rajendran unterstreicht die Idee, dass Nanopartikel hauptsächlich auf der Quantenpunktskala in allen Lösungen zu finden sind [47]; ihre Partikelgrößen sind in etwa ähnlich zu unseren Daten. Diese nanopartikuläre Perspektive wird auch durch unsere Erkenntnisse gestützt, aber darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass die Struktur von AUR Nanopartikeln und Clusteranordnungen aus kleineren oder größeren Nanostrukturen kombiniert. Diese Clusteranordnungen sind bei hohen Verdünnungen jenseits der Avogadro-Zahl deutlicher und werden von der Art des Lösungsmittels und dem Potenzierungsgrad beeinflusst; je höher die Potenz ist, desto verzweigter und größer sind die gebildeten Strukturen. Die Ausdehnung dieser Organisation über einen großen Bereich sollte zu stabileren Strukturen führen und könnte mit dem Konstruktionsgesetz von Design und Evolution in der Natur übereinstimmen, wie es von Bejan und Lorente [46] beschrieben wurde.

Zusätzlich zur TEM-EDX-Studie untersuchten wir, ob eine auf Raman-Spektroskopie und DL basierende Methodik in der Lage ist, Lösungen zu klassifizieren, die sich in ihrer Struktur nicht signifikant unterscheiden, wie z. B. i) PW- gegenüber UW-Lösungen, die subtile Unterschiede aufweisen, da das in diesen Experimenten verwendete UW im Wesentlichen ein teilweise gereinigtes Wasser ist, das in Kosmetika verwendet wird, und ii) PW- gegenüber AUR-Lösungen, bei denen die Unterschiede auf das Vorhandensein sehr geringer Goldkonzentrationen in den AUR-Proben zurückzuführen sind. Darüber hinaus erzeugen die Komplexität und Dynamik wasserbasierter Strukturen eine Reaktion im untersuchten Raman-Bereich (insbesondere im OH-Streckbereich), wie von Sun [32] und mehreren anderen Autoren [28], [29], [30], [31] gezeigt wurde.

Die für alle drei untersuchten Situationen (Klassifizierung aller Klassen, Klassifizierung der Potenzen innerhalb jeder Gruppe (AUR, PW und UW) oder Klassifizierung innerhalb derselben Potenzierungsstufe (6C, 30C und 200C) erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich DL-Ansätze zur einfachen und effektiven Erkennung verschiedener Klassen verwenden lassen. Im Datensatz ohne Baseline (d. h. bg-vorbehandelt) ist das GRU-Modell nicht in der Lage, den Datentrend in seiner Gesamtheit zu erfassen. Um für bg-vorbehandelte Daten bessere Ergebnisse zu erzielen, haben wir eine quantisierte Normalisierung eingesetzt. Darüber hinaus wurde in diesem Fall die Batch-Normalisierungstechnik erst nach der letzten dichten Schicht des Modells angewendet. Als Erweiterung der vorliegenden Studie könnte ein Modell mit zwei Erkennungsstufen vorgeschlagen werden. Das erste Modell wäre für die Bestimmung des Probenotyps zuständig, während das zweite Modell die Testproben innerhalb der Probenotypklasse in Unterklassen aufteilen könnte. Dieses Verfahren nimmt deutlich mehr Zeit in Anspruch, dürfte aber zu besseren Ergebnissen führen. Darüber hinaus kann die Verwendung einer spektralen Segmentierungsmethode auf Grundlage der Ergebnisse der Unterscheidungsstudie mit allen 11 Klassen und einem Datenerweiterungsansatz als wertvolle Strategie zur Verbesserung der Modellvorhersagegenauigkeit angesehen werden.

5. Schlussfolgerung

Insgesamt können wir durch die Analyse der Ergebnisse von TEM-EDX und der auf Raman-Spektroskopie und DL-Algorithmen basierenden Methodik argumentieren, dass diese Methoden erfolgreich zur Charakterisierung von ultrahohen Verdünnungen eingesetzt werden können. Diese Reihe von Techniken enthüllte eine Modalität, die die Grundlage für die Unterscheidung verschiedener Heilmittel entsprechend der Art der zur Herstellung der Heilmittel verwendeten Ausgangsstoffe sein könnte oder die Unterscheidung von Proben

anhand ihres Potenzierungsniveaus ermöglichen könnte. Dieser Ansatz ermöglicht die Analyse der hochverdünnten Lösungen in einem weitaus größeren Maßstab als in der Vergangenheit möglich war.

CRedit-Autorenbeitragsklärung

Camelia Berghian-Grosan: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Überwachung, Methodik, Untersuchung, Datenkuratierung, Konzeptualisierung. Sahin Isik: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Software, Methodik. Alin Sebastian Porav: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Methodik, Untersuchung. Ilknur Dag: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Überwachung, Methodik. Kursad Osman Ay: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Methodik, Untersuchung. George Vithoulkas: Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, Schreiben – Originalentwurf, Methodik, Konzeptualisierung.

Erklärung zu widerstrebenden Interessen

Camelia Berghian-Grosan und George Vithoulkas berichten, dass die Veröffentlichungsgebühren für den Artikel von der International Academy of Classical Homeopathy übernommen wurden. George Vithoulkas berichtet von einer Beziehung zur International Academy of Classical Homeopathy, die Folgendes umfasst: Vorstandsmitgliedschaft. Falls andere Autoren vorhanden sind, erklären sie, dass ihnen keine widerstrebenden finanziellen Interessen oder persönlichen Beziehungen bekannt sind, die die in diesem Artikel berichtete Arbeit beeinflusst haben könnten.

Danksagungen

Die Autoren möchten der International Academy for Classical Homeopathy (I.A.C.H.) – Alonissos (Griechenland) für die Unterstützung dieser Forschung und Dr. Drosos Kourounis für seine Vorschläge und Korrekturen danken, die die Qualität dieses Manuskripts erheblich verbessert haben. Besonderer Dank gilt der Korres-Apotheke und Herrn George Korres (Griechenland, www.korres.com) für die Herstellung der homöopathischen Lösungen.

Anhang A. Ergänzendes Material

Die folgenden ergänzenden Daten sind zu diesem Artikel zu finden:

Download: Word-Dokument herunterladen (8 MB)

Ergänzende Daten 1.

Datenverfügbarkeit

Daten werden auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

Literaturverzeichnis

1. [\[1\]](#)

S. Hahnemann, Organon of Medicine, 6th ed., B. Jain Publishers (P) Ltd, 2012.

[Google Scholar](#)

2. [\[2\]](#)

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)

[Google Scholar](#)

3. [\[3\]](#)

T.F. Allen

A handbook of materia medica and homoeopathic therapeutics

F.E. Boericke, Philadelphia (1889)

[Google Scholar](#)

4. [\[4\]](#)

J.T. Kent, Lectures on Homoeopathic Materia Medica, reprint, B. Jain Publications, 2005.

[Google Scholar](#)

5. [\[5\]](#)

G. Vithoukas

Materia Medica Viva 1-3

Homeopathic Book Publishers, London (1995)

[Google Scholar](#)

6. [\[6\]](#)

G. Vithoulkas, *Materia Medica Viva* 4-13, International Academy of Classical Homeopathy, Alonissos, 1997-2021.

[Google Scholar](#)

7. [7]

P. Nandy

A review of basic research on homoeopathy from a physicist's point of view

Indian J. Res. Homoeopathy, 9 (2015), p. 141, [10.4103/0974-7168.166372](#)

[View at publisher](#)

[Google Scholar](#)

8. [8]

P. Bellavite, M. Marzotto, D. Olioso, E. Moratti, A. Conforti

High-dilution effects revisited. 1. physicochemical aspects

Homeopathy, 103 (2014), pp. 4-21, [10.1016/j.homp.2013.08.003](#)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

9. [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), pp. 15864-15875, [10.1021/la303477s](#)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

10. [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), pp. 231-242, [10.1016/j.homp.2010.05.006](#)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

11. [11]

G.S. Anagnostatos, G. Vithoulkas, P. Garzonis, C. Tavouxoglou

A working hypothesis for homœopathic microdiluted remedies

Br. Homoeopath. J., 81 (1992), p. 67, [10.1016/S0007-0785\(05\)80310-2](#)

[View PDF](#)[View article](#)[Google Scholar](#)

12. [12]

M.O. Kokornaczyk, S. Würtenberger, S. Baumgartner

Impact of succession on pharmaceutical preparations analyzed by means of patterns from evaporated droplets

Sci. Rep., 10 (2020), p. 570, [10.1038/s41598-019-57009-2](https://doi.org/10.1038/s41598-019-57009-2)

[View at publisher](#)

This article is free to access.

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

13. [\[13\]](#)

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), pp. 602-611, [10.1002/jps.24259](https://doi.org/10.1002/jps.24259)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

14. [\[14\]](#)

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), pp. 1601-1612, [10.1002/jps.23973](https://doi.org/10.1002/jps.23973)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

15. [\[15\]](#)

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), pp. 9-

15, [10.1089/acm.2007.0770](https://doi.org/10.1089/acm.2007.0770)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

16. [\[16\]](#)

V. Elia, M. Niccoli

New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions

J. Therm. Anal. Calorim., 75 (2004), pp. 815-

836, [10.1023/B:JTAN.0000027178.11665.8f](https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000027178.11665.8f)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

17. [\[17\]](#)

I. Botha, A.H.A. Ross

A nuclear magnetic resonance spectroscopy comparison of ^{13}C trituration derived and ^{14}C trituration derived remedies

Homeopathy, 97 (2008), pp. 196-201, [10.1016/j.homp.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.homp.2008.08.008)
[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[View in Google Scholar](#)
18. [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), pp. 223-239, [10.1016/j.homp.2017.08.001](https://doi.org/10.1016/j.homp.2017.08.001)
[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[View in Google Scholar](#)
19. [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), pp. 244-263, [10.1055/s-0038-1666864](https://doi.org/10.1055/s-0038-1666864)
[View at publisher](#)
This article is free to access.
[View in Scopus](#)[View in Google Scholar](#)
20. [20]

F. Esposito, U. Wolf, S. Baumgartner

NMR relaxation time investigation of highly diluted aqueous solutions of silica-lactose

J. Mol. Liq., 337 (2021), Article 115975, [10.1016/j.molliq.2021.115975](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115975)
[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[View in Google Scholar](#)
21. [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), pp. 042-051, [10.1055/s-0040-1710022](https://doi.org/10.1055/s-0040-1710022)
[View at publisher](#)
[Google Scholar](#)
22. [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), pp. 11-28

<https://doi.org/10.51910/ijhdr.v20i4.1113>

[Google Scholar](#)

23. [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), pp. 67-84

<https://doi.org/10.51910/ijhdr.v21icf.1181>

[Google Scholar](#)

24. [24]

H.N. Bhargaw, 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),

Article 116365, [10.1016/j.mseb.2023.116365](https://doi.org/10.1016/j.mseb.2023.116365)

[View PDFView articleView in ScopusGoogle Scholar](#)

25. [25]

E. Davenas, F. Beauvais, J. Amara, M. Oberbaum, B. Robinzon, A. Miodonnai, 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), pp. 816-818, [10.1038/333816a0](https://doi.org/10.1038/333816a0)

[View at publisher](#)

[View in ScopusGoogle Scholar](#)

26. [26]

G. Vithoukas

The controversy over the “Memory of Water”

Med. Sci. Hypotheses, 4 (2017), pp. 1-6

<https://doi.org/10.12659/MSH.901167>

View at publisher
[CrossRef](#)[Google Scholar](#)
27. [27]

B. Bagchi

Water in biological and chemical processes: from structure and dynamics to function

Cambridge University Press (2013)

[Google Scholar](#)
28. [28]

A. Nilsson, L.G.M. Pettersson

The structural origin of anomalous properties of liquid water

Nat. Commun., 6 (2015), p. 8998, [10.1038/ncomms9998](https://doi.org/10.1038/ncomms9998)

View at publisher
This article is free to access.
[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)
29. [29]

L.G.M. Pettersson, R.H. Henchman, A. Nilsson

Water-the Most Anomalous Liquid

Chem. Rev., 116 (2016), pp. 7459-7462, [10.1021/acs.chemrev.6b00363](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00363)

View at publisher
This article is free to access.
[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)
30. [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), pp. 2065-2073, [10.1039/C7SC04205A](https://doi.org/10.1039/C7SC04205A)

[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)
31. [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), pp. 7590-7607, [10.1021/acs.chemrev.5b00640](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00640)

View at publisher

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

32. [32]

Q. Sun

The Raman OH stretching bands of liquid water

Vib. Spectrosc, 51 (2009), pp. 213-217, [10.1016/j.vibspec.2009.05.002](#)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

33. [33]

S. Guo, J. Popp, T. Bocklitz

Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning-based modeling

Nat. Protoc., 16 (2021), pp. 5426-5459, [10.1038/s41596-021-00620-3](#)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

34. [34]

C.M. Bishop

Neural networks for pattern recognition

Clarendon Press, Oxford (1995)

[Google Scholar](#)

35. [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)

[Google Scholar](#)

36. [36]

J.F. Díez-Pastor, S.E. Jorge-Villar, Á. 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), pp. 1563-1574, [10.1002/jrs.5509](#)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

37. [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), pp. 1936-1954, [10.1021/acs.jcim.9b01037](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01037)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

38. [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), Article 115796, [10.1016/j.trac.2019.115796](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115796)

[View PDF](#)[View article](#)[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

39. [39]

Y. Lecun, L. Bottou, Y. Bengio, P. Haffner

Gradient-based learning applied to document recognition

Proc. IEEE, 86 (1998), pp. 2278-2324, [10.1109/5.726791](https://doi.org/10.1109/5.726791)

[View at publisher](#)

[Google Scholar](#)

40. [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>.

[Google Scholar](#)

41. [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>.

[Google Scholar](#)

42. [42]

R. Pascanu, T. Mikolov, Y. Bengio, On the difficulty of training Recurrent Neural Networks,

2013. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.1211.5063>.

[Google Scholar](#)

43. [43]

KORRES Homeopathic Production Unit, An Introduction to Homeopathic Pharmacopoeia and Production Guidelines, (n.d.). <https://youtube/NkNe-33Q008> (accessed April 23, 2023).

[Google Scholar](#)

44. [44]

OriginPro, OriginLab Corporation. Create and Subtract Baseline with Peak Analyzer <https://www.originlab.com/doc/Tutorials/Create-Subtract-Baseline> (accessed March 12, 2024).

[Google Scholar](#)

45. [45]

F. Chen, Y. Wang, J. Ma, G. Yang

A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by tris(hydroxymethyl)aminomethane

Nanoscale Res. Lett., 9 (2014), p. 220, [10.1186/1556-276X-9-220](https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-220)

[View at publisher](#)

This article is free to access.

[Google Scholar](#)

46. [46]

A. Bejan, S. Lorente

The constructal law of design and evolution in nature

Phil. Trans. R. Soc. B, 365 (2010), pp. 1335-1347, [10.1098/rstb.2009.0302](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0302)

[View at publisher](#)

[View in Scopus](#)[Google Scholar](#)

47. [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), pp. 48923-48927

[Google Scholar](#)