# Analysis of Variance of HPLC Data

### Vidianos Giannitsis

### January 20, 2024

### Contents

T	Dependencies	1
2	Φόρτωση των δεδομένων	2
3	Επεξεργασία πρωτογενών δεδομένων	2
4	<b>Δημιουργία ψευδο-κατανομής των δεδομένων</b> 4.1 Pre-processing	4
5	ANOVA	5
6	<ul> <li>'Αλλα hypothesis tests</li> <li>6.1 ANOVA σε 2 mL και πάνω</li> <li>6.2 T-test για 4-8 ml στους 40</li> <li>6.3 ANOVA σε 2 ml και κάτω στους 35</li> <li>6.4 Επίδραση της θερμοκρασίας</li> </ul>	8 8
7	<b>Τελικά Συμπεράσματα</b> 7.1 Απόρριψη με 99% βεβαιότητα	10

#### Abstract

Έχουμε πάρει πολλά δεδομένα από την HPLC για διάφορες συγχεντρώσεις σε χάθε πείραμα. Ένα χαλό ερώτημα το οποίο δεν έχουμε εξετάσει είναι χατά πόσο είναι στατιστιχά σημαντιχή η προσθήχη του μιξ γενιχά ή χαι ξεχωριστά από το ένα επίπεδο στο άλλο. Σχοπός του αρχείου αυτού είναι να εξετάσει χάτι τέτοιο με χρήση της ANOVA.

## 1 Dependencies

Αρχικά, όπως και στα άλλα notebooks, πρέπει να κάνουμε load κάποια dependencies τα οποία θα χρειαστούμε για αυτό το code base.

```
using DrWatson
@quickactivate "Masters_Thesis"
```

```
include(srcdir("filenames.jl"))
using CSV, DataFrames, Statistics, Distributions
```

# 2 Φόρτωση των δεδομένων

Έπειτα, πρέπει να διαβάσουμε τα CSVs με τα δεδομένα για να μπορέσουμε να κάνουμε την ανάλυση μας.

```
# Read all the data
\exp_{35} = "10_{11}"
\exp_40 = "28_{11}"
mix_amount = ["0", "1", "2", "4", "8"]
# Experiment @35 C
df35_0 = CSV.read(get_conc_csv(exp_35, mix_amount[1]), DataFrame)
df35_1 = CSV.read(get_conc_csv(exp_35, mix_amount[2]), DataFrame)
df35_2 = CSV.read(get_conc_csv(exp_35, mix_amount[3]), DataFrame)
df35_4 = CSV.read(get_conc_csv(exp_35, mix_amount[4]), DataFrame)
df35_8 = CSV.read(get_conc_csv(exp_35, mix_amount[5]), DataFrame)
# Experiment @40 C
df40_0 = CSV.read(get_conc_csv(exp_40, mix_amount[1]), DataFrame)
df40_1 = CSV.read(get_conc_csv(exp_40, mix_amount[2]), DataFrame)
df40_2 = CSV.read(get_conc_csv(exp_40, mix_amount[3]), DataFrame)
df40_4 = CSV.read(get_conc_csv(exp_40, mix_amount[4]), DataFrame)
df40_8 = CSV.read(get_conc_csv(exp_40, mix_amount[5]), DataFrame)
```

# 3 Επεξεργασία πρωτογενών δεδομένων

Βέβαια, δεν θέλουμε αυτούς τους πίνακες. Αρχικά θέλουμε να συγκρίνουμε τις 5 ποσότητες σε κάθε θερμοκρασία, οπότε θέλουμε τα vector των τελικών συγκεντρώσεων κάθε ένωσης.

```
# Take the maximum instead of defaulting for the last element as we
# know ethanol is consumed so the last isn't the maximum which is the
# one we are interested in.
prod35_0 = map(maximum, eachcol(df35_0[:, 5:8]))
prod35_1 = map(maximum, eachcol(df35_1[:, 5:8]))
prod35_2 = map(maximum, eachcol(df35_2[:, 5:8]))
prod35_4 = map(maximum, eachcol(df35_4[:, 5:8]))
prod35_8 = map(maximum, eachcol(df35_8[:, 5:8]))
prod40_0 = map(maximum, eachcol(df40_0[:, 5:8]))
prod40_1 = map(maximum, eachcol(df40_2[:, 5:8]))
prod40_2 = map(maximum, eachcol(df40_4[:, 5:8]))
prod40_4 = map(maximum, eachcol(df40_4[:, 5:8]))
```

```
prod40_8 = map(maximum, eachcol(df40_8[:, 5:8]))
prod45_1 = map(maximum, eachcol(df45_1[:, 5:8]))
prod45_2 = map(maximum, eachcol(df45_2[:, 5:8]))

prod_35 = hcat(prod35_0, prod35_1, prod35_2, prod35_4, prod35_8)
prod_40 = hcat(prod40_0, prod40_1, prod40_2, prod40_4, prod40_8)

# Collect the 4 vectors which have the output variable in every condition
lact_mean_35 = prod_35[1,:]
acet_mean_35 = prod_35[2,:]
prop_mean_35 = prod_35[4,:]

lact_mean_40 = prod_40[1,:]
acet_mean_40 = prod_40[2,:]
prop_mean_40 = prod_40[3,:]
eth_mean_40 = prod_40[4,:]
```

# $4-\Delta$ ημιουργία ψευδο-κατανομής των δεδομένων

Για να κάνουμε ANOVA χρειάζεται κάθε μέτρηση να έχει ένα sample size μεγαλύτερο του 1 (και εφόσον κάνουμε στατιστική ανάλυση, τυπικά θέλουμε πάνω από 5 για στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα). Δεν μπορούμε να κάνουμε το πείραμα τόσες φορές, οπότε χρειαζόμαστε έναν μηχανισμό για να φτιάξουμε δεδομένα.

Ένα claim το οποίο δεν είναι κακό είναι ότι αν κάναμε πολλές φορές το πείραμα, τα αποτελέσματα θα ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οπότε, με έναν μέσο όρο και μία τυπική απόκλιση, μπορούμε να φτιάξουμε δεδομένα τα οποία θα είναι περίπου σωστά και να τρέξουμε με αυτά την ΑΝΟΥΑ. Οι μέσοι όροι θα είναι προφανώς οι τιμές που θα έχουμε παρατηρήσει. Για τις τυπικές αποκλίσεις θέλουμε κάτι άλλο. Με βάση τα στοιχεία που έχουμε, μία εύλογη εκτίμηση είναι να πούμε πως ξέρουμε ότι στην αρχή είχαμε 5 υποτίθεται ίδια δείγματα. Οπότε όποια διαφορά έχουν οφείλεται στην τυπική απόκλιση του δείγματος. Οπότε, ας υποθέσουμε ότι το variance που έχουν αυτά θα το έχουν και τα προιόντα και ας κάνουμε κατανομές αυτές τις τυπικές αποκλίσεις.

#### 4.1 Pre-processing

Για να πάρουμε τα δεδομένα ακολουθούμε μία παρόμοια λογική με παραπάνω και μόλις βρούμε τα διανύσματα που θέλουμε υπολογίζουμε το standard deviation τους.

```
input35_0 = Vector(df35_0[1, 5:8])
input35_1 = Vector(df35_1[1, 5:8])
input35_2 = Vector(df35_2[1, 5:8])
input35_4 = Vector(df35_4[1, 5:8])
input35_8 = Vector(df35_8[1, 5:8])
input40_0 = Vector(df40_0[1, 5:8])
input40_1 = Vector(df40_1[1, 5:8])
```

```
input40_2 = Vector(df40_2[1, 5:8])
input40_4 = Vector(df40_4[1, 5:8])
input40_8 = Vector(df40_8[1, 5:8])
input_35 = hcat(input35_0, input35_1, input35_2, input35_4, input35_8)
input_40 = hcat(input40_0, input40_1, input40_2, input40_4, input40_8)
# Collect the 4 vectors which have the input variables in every
# condition
lact_input_35 = input_35[1,:]
acet_input_35 = input_35[2,:]
prop_input_35 = input_35[3,:]
eth_input_35 = input_35[4,:]
lact_input_40 = input_40[1,:]
acet_input_40 = input_40[2,:]
prop_input_40 = input_40[3,:]
eth_input_40 = input_40[4,:]
# Calculate standard deviations of samples
lact_std_35 = std(lact_input_35)
acet_std_35 = std(acet_input_35)
prop_std_35 = std(prop_input_35)
eth_std_35 = std(eth_input_35)
lact_std_40 = std(lact_input_40)
acet_std_40 = std(acet_input_40)
prop_std_40 = std(prop_input_40)
eth_std_40 = std(eth_input_40)
```

### 4.2 Δημιουργία των κατανομών

Έχοντας την τυπική απόκλιση και τον μέσο όρο μπορούμε να φτιάξουμε τις κατανομές. Χάριν ευκολίας, θα φτιαχτούν vectorized κατανομές.

### 4.3 Sampling

Έχοντας τις κατανομές, μπορούμε να κάνουμε sample έναν αριθμό από δείγματα για να τρέξουμε την ΑΝΟVA. Εφόσον έχουμε την δυνατότητα να πάρουμε όσα samples θέλουμε, μπορούμε να βάλουμε και μεγάλα νούμερα, αλλά για παράδειγμα 20 δείγματα είναι μάλλον ένα καλό νούμερο.

```
samples = 20
lact_samples_35 = [rand(lact_dist_35[i], samples) for i in
→ 1:length(lact_mean_35)]
acet_samples_35 = [rand(acet_dist_35[i], samples) for i in
→ 1:length(acet_mean_35)]
prop_samples_35 = [rand(prop_dist_35[i], samples) for i in
→ 1:length(prop_mean_35)]
eth_samples_35 = [rand(eth_dist_35[i], samples) for i in
→ 1:length(eth_mean_35)]
lact_samples_40 = [rand(lact_dist_40[i], samples) for i in
→ 1:length(lact_mean_40)]
acet_samples_40 = [rand(acet_dist_40[i], samples) for i in
→ 1:length(acet_mean_40)]
prop_samples_40 = [rand(prop_dist_40[i], samples) for i in
→ 1:length(prop_mean_40)]
eth_samples_40 = [rand(eth_dist_40[i], samples) for i in
→ 1:length(eth_mean_40)]
```

#### 5 ANOVA

Έχοντας κάνει sample έχουμε τώρα κάποια διανύσματα όπου τα καθένα έχει 20 παρατηρήσεις και μπορεί να γίνει μία ANOVA για να δείξει σε ποιά από τα 8 συστήματα (4 προιόντα, 2 θερμοκρασίες) έπαιξε όντως ρόλο η προσθήκη του μιξ και σε ποιά δεν φαίνεται να έπαιξε. Αρχικά, γράφουμε ένα function που κάνει implement την ANOVA.

```
<<dependencies>>
function manualANOVA(allData)
   nArray = length.(allData)
   d = length(nArray)

xBarTotal = mean(vcat(allData...))
xBarArray = mean.(allData)
```

και έπειτα το εφαρμόζουμε στα 8 διανύσματα που παράξαμε πριν. Το output  $\theta$ α είναι η τιμή του f-statistic καθώς και το p-value. Τυπικά σε μία ANOVA, αν το f-statistic είναι κοντά στο 1 δεν μπορούμε να απορρίψουμε την υπόθεση  $H_0$  η οποία λέει πως δεν έπαιξε ρόλο η προσθήκη του mix αλλά έγινε τυχαία. Το p-value μας λέει με τι βεβαιότητα απορρίπτουμε ή όχι την υπόθεση.

Από τα αποτελέσματα αυτά, είναι εμφανές πως η ποσότητα του mix που προστίθεται είναι σίγουρα σημαντική επειδή όλα τα p-values είναι πάρα πολύ χαμηλά.

Μπορούμε επίσης να τα αποθηκεύσουμε σε έναν ωραίο πίνακα:

```
CSV.write(datadir("exp_pro", "anova_35_40.csv"), anova_table)
DataFrame(anova_table)
```

### 6 Άλλα hypothesis tests

#### 6.1 ΑΝΟVΑ σε 2 mL και πάνω

Από τα διαγράμματα που είχαμε κάνει, είχε παρατηρηθεί πως ενδέχεται να μην έχει νόημα να βάλουμε πάνω από 2 ml του mix. Στους 35, η συμπεριφορά που παρατηρήθηκε ήταν καθαρά αρνητική ενώ στους 40 σε πολλά φάνηκε να είναι περίπου αμελητέα αν όχι αρνητική. Οπότε, έχει νόημα να κάνουμε anova και εδώ για να δούμε τι βγάζει.

```
lact_anova_35_2plus = manualANOVA(lact_samples_35[3:5])
acet_anova_35_2plus = manualANOVA(acet_samples_35[3:5])
prop_anova_35_2plus = manualANOVA(prop_samples_35[3:5])
eth_anova_35_2plus = manualANOVA(eth_samples_35[3:5])
lact_anova_40_2plus = manualANOVA(lact_samples_40[3:5])
acet_anova_40_2plus = manualANOVA(acet_samples_40[3:5])
prop_anova_40_2plus = manualANOVA(prop_samples_40[3:5])
eth_anova_40_2plus = manualANOVA(eth_samples_40[3:5])
anova_35_2plus = reshape([lact_anova_35_2plus..., acet_anova_35_2plus...,
→ prop_anova_35_2plus..., eth_anova_35_2plus...], 2, 4)
anova_40_2plus = reshape([lact_anova_40_2plus..., acet_anova_40_2plus...,

→ prop_anova_40_2plus..., eth_anova_40_2plus...], 2, 4)
anova_data_2plus = hcat(anova_35_2plus, anova_40_2plus)
anova_table_2plus = Tables.table(hcat(names, anova_data_2plus'), header =
CSV.write(datadir("exp_pro", "anova_35_40_2plus.csv"), anova_table_2plus)
DataFrame(anova_table_2plus)
2×4 Matrix{Float64}:
 390.101
               5.21984
                           4.37956
                                      145.021
  5.51787e-34 0.00828594 0.0170094
                                       4.38079e-23
```

Προχύπτει πως στους 35 όλες οι μεταβολές είναι στατιστικά σημαντικές και είναι όλες μειώσεις. Οπότε σίγουρα δεν θέλουμε πάνω από 2 ml. Στους 40, η αιθανόλη μειώνεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο ενώ το γαλακτικό αυξάνεται. Το οξικό και το προπιονικό και αυτά αυξάνονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο, αλλά έχουν πολύ μεγαλύτερα p-values. Συγκεκριμένα το οξικό μπορούμε να απορρίψουμε την  $H_0$  με confidence interval 99% αλλά οριακά και στο προπιονικό μπορούμε με interval 95%. Οπότε στους 40 υπάρχει επαρκής evidence για να πάμε σε πάνω από 2 ml.

#### 6.2 T-test για 4-8 ml στους 40

Εφόσον στους 40 υπάρχει evidence για να πάμε πάνω από 2 ml, αξίζει να δούμε και αν υπάρχει evidence για να πάμε στα 8 ml ή αν δεν είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το 4.

Τα αποτελέσματα του test αυτού δείχνουν πως η αλλαγή του οξικού και του προπιονικού δεν είναι στατιστικά σημαντική (το οξικό με μεγάλη βεβαιότητα, το προπιονικό οριακά δεν μπορεί να απορριφθεί στο 95%) ενώ η αιθανόλη μειώνεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Οπότε, αν σκεφτούμε το αυξημένο κόστος της προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας, αφού επηρεάζεται μόνο το γαλακτικό, δεν είναι στατιστικά σημαντική η προσθήκη 8 ml σε αντίθεση με τα 4.

#### 6.3 ΑΝΟΥΑ σε 2 ml και κάτω στους 35

Εφόσον στους 35 δεν έχει νόημα να πάμε πάνω από 2, αξίζει να εξεταστεί αν έχει νόημα και το 2 ή μήπως ούτε αυτό χρειάζεται και θα λειτουργούσε το ίδιο και χωρίς ένζυμα.

Προκύπτει με πολύ μεγάλη βεβαιότητα ότι οι μεταβολές που υπάρχουν μεταξύ αυτών των 3 είναι στατιστικά σημαντικές. Βέβαια, το οξικό και το προπιονικό μειώνονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο, δεν αυξάνονται.

### 6.4 Επίδραση της θερμοχρασίας

Εκτός από τα παραπάνω που έδειξαν ότι οι διαφορετικές παίζουν ρόλο και ανάλογα με το τι θέλουμε επιλέγουμε ποια θα πάρουμε, έχει νόημα να εξετάσουμε και αν είναι στατιστικά σημαντική η επίδραση της θερμοκρασίας. Για αυτό, πρέπει να κάνουμε t-test μεταξύ ίδιων ποσοτήτων στις 2 θερμοκρασίες. Ο κώδικας για αυτό είναι παρακάτω.

```
# Run the hypothesis tests
lact_temp_ttest = [UnequalVarianceTTest(lact_samples_35[i],
→ lact_samples_40[i]) for i in 1:length(lact_samples_35)]
acet_temp_ttest = [UnequalVarianceTTest(acet_samples_35[i],
→ acet_samples_40[i]) for i in 1:length(acet_samples_35)]
prop_temp_ttest = [UnequalVarianceTTest(prop_samples_35[i],
→ prop_samples_40[i]) for i in 1:length(prop_samples_35)]
eth_temp_ttest = [UnequalVarianceTTest(eth_samples_35[i],

    eth_samples_40[i]) for i in 1:length(eth_samples_35)]

# Get the pvalues of each test
lact_temp_pvalues = pvalue.(lact_temp_ttest)
acet_temp_pvalues = pvalue.(acet_temp_ttest)
prop_temp_pvalues = pvalue.(prop_temp_ttest)
eth_temp_pvalues = pvalue.(eth_temp_ttest)
# Format them in a nice table and write it to CSV
temp_ttest_table = Tables.table(hcat(mix_amount, lact_temp_pvalues,
→ acet_temp_pvalues, prop_temp_pvalues, eth_temp_pvalues), header =
    [:Mix_Amount, :Lactate, :Acetate, :Propionate, :Ethanol])
CSV.write(datadir("exp_pro", "temp_ttest.csv"), temp_ttest_table)
DataFrame(temp_ttest_table)
```

Από τα αποτελέσματα, είναι εμφανές πως η θερμοκρασία παίζει ρόλο παντού. Αξίζει να σημειωθεί πως σε 2 τιμές του οξικού και μία του προπιονικού, ο ρόλος της θερμοκρασίας δεν είναι σίγουρος, αλλά με 95% βεβαιότητα μπορούμε να απορρίψουμε την υπόθεση ότι δεν παίζει ρόλο παντού.

# 7 Τελικά Συμπεράσματα

Στο αρχείο αυτό έγιναν διάφορα hypothesis tests με σχοπό να δούμε αν οι παραμέτροι που ελέγχουμε έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στην τελική συγκέντρωση των προιόντων. Σε γενικές γραμμές, οι περισσότερες παραμέτροι έχουν σημαντική επίδραση. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, αυτό το συμπέρασμα δεν μπορεί να βγεί με τόση βεβαιότητα ή δεν μπορεί να βγεί καθόλου.

Τα τεστ που έγιναν είναι τα εξής: ANOVA μεταξύ των 5 διαφορετικών ποσοτήτων mix στις 2 δύο θερμοκρασίες και στα 4 προιόντα. ANOVA μεταξύ των ποσοτήτων 2, 4 και 8 ml και στις 2 θερμοκρασίες για να δούμε αν πραγματικά επιφέρει κάτι η προσθήκη πάνω από 2 ml. t-test μεταξύ 4 και 8 ml στους 40 (όπου είχε νόημα να αυξήσουμε πάνω από 2 ml με βάση το προηγούμενο). ANOVA μεταξύ 0, 1 και 2 ml στους 35 για να δούμε αν έχουν νόημα τα 2 ml επειδή τα παραπάνω σίγουρα δεν έχουν. t-test συγκρίνοντας τις 2 θερμοκρασίες για κάθε mix<sub>amount</sub> και ένωση.

Καθώς οι περισσότερες υποθέσεις απορρίφθηκαν με μεγάλη βεβαιότητα (μεγαλύτερη από 99.99%), παρακάτω θα σημειωθούν όσες απορρίφθηκαν με λιγότερη ή δεν μπόρεσαν να απορριφθούν.

## 7.1 Απόρριψη με 99% βεβαιότητα

Το οξικό στους 40 για ποσότητες 2-8 ml. Το t-test για την θερμοκρασία στα 0 ml οξικού.

# 7.2 Απόρριψη με 95% βεβαιότητα

Το προπιονικό στους 40 για ποσότητες 2-8 ml. Το t-test για την θερμοκρασία στο 1 ml οξικό και στα 2 ml προπιονικό.

# 7.3 Δεν μπόρεσαν να απορριφθούν

Το t-test για το οξικό και το προπιονικό στους 40 μεταξύ 4 και 8 ml.