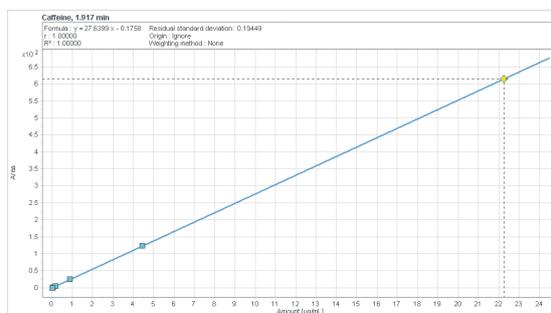


## オートサンプラによるピペッティングの自動化

Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラおよび  
マルチサンプラのインジェクタプログラムを用いた  
キャリブレーション溶液の調製



### 著者

Sonja Schipperges  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

Agilent オートサンプラのインジェクタプログラムにより、キャリブレーション溶液の調製などの分注のワークフローを自動化できます。分注手順の自動化により、手作業で生じる時間と費用を低減できます。この技術概要では、インジェクタプログラムと Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラまたは Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラを組み合わせて、キャリブレーション溶液と標準希釈液を調製し、検出限界および定量限界（LOD および LOQ）を求める手順を解説します。オートサンプラで調製したキャリブレーション溶液を使用すると、キャリブレーションのための優れた直線性が得られます。手作業で調製したキャリブレーション溶液を使用した場合と異なり、オペレータのスキルに結果が左右されることもありません。

## はじめに

定量化のためのキャリブレーション溶液の調製などの分注のワークフローは、手作業で実施すると多大な労力と時間がかかります。さらに、手作業で調製したキャリブレーション溶液を使用して得た結果の品質は、オペレータのスキルに大きく依存します。

1260 Infinity II バイアル サンプラ および 1260 Infinity II マルチ サンプラ などの Agilent オート サンプラ では、インジェクタ プログラム により、連続して実施する一連の操作をすることが可能です。インジェクタ プログラム は、キャリブレーション 溶液の調製用のオート サンプラ を使用することができ、それによって手作業での分注手順を回避し、手作業で生じる時間と費用を削減できます。さらに、オート サンプラ で調製したキャリブレーション 溶液を使用して得られた結果は、オペレータのスキルに左右されません。

この技術概要では、インジェクタ プログラム とともに、Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと 1260 Infinity II バイアル サンプラ または 1260 Infinity II マルチ サンプラ を用いて、キャリブレーション 溶液を調製する方法を解説します。キャリブレーション 溶液は、例証のためにサンプルとしてカフェインを使用し、段階希釈によって調製しました。オート サンプラ で調製したキャリブレーション 溶液を用いて得られた結果を、手作業で調製したキャリブレーション 溶液を用いて得られた結果と比較します。比較を可能にするために、両方のキャリブレーション を用いてコントロール サンプル を分析し、評価します。LOD および LOQ を得るために、オート サンプラ による段階希釈も実施します。標準を段階希釈して分析することで、S/N 比に基づいて定義される LOD に最も近い濃度を決定することが可能です。

## 実験方法

### 機器

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムの構成は次のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- 次のサンプラ構成のいずれか：Agilent 1260 Infinity II バイアル サンプラ (G7129C) と 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ (デフォルト設定)、サンプルサーモスタット (オプション #101) 付き
- または：Agilent 1260 Infinity II マルチ サンプラ (G7167A) と 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ (デフォルト設定)、または 900 µL 分析ヘッド (オプション #163) および 900 µL ループ (オプション #156)、サンプルサーモスタット (オプション #101) 付き
- Agilent 1260 Infinity II マルチ カラム サーマスタット (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C) と 10 mm の InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G4212-60008)

### ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.3

### カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 mm × 50 mm、2.7 µm (p/n 699775-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 mm × 50 mm、2.7 µm (p/n 699975-902)

### 試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (Millipak、EMD Millipore 社、ベルリカ、マサチューセッツ州、米国) で精製しました。カフェインは Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

## サンプル

カフェインをサンプルとして使用し、キャリブレーション 溶液調製用のインジェクタ プログラム の使用方法を示します。100 µg/mL カフェイン原液を水/アセトニトリル (98/2；v/v) で、5 倍段階希釈します。原液を希釈調製し、20、4、0.8、0.16、0.032、0.006、0.001 µg/mL のカフェインを含む 7 濃度のキャリブレーション 溶液を作製します。キャリブレーション を 0.006 ~ 20 µg/mL の範囲で分析します。0.006 µg/mL のキャリブレーション 溶液をさらに希釈して S/N 比に基づいて LOD を求めます。

オート サンプラ で調製したキャリブレーション 溶液を用いて得られた結果を、手作業で調製したキャリブレーション 溶液を用いて得られた結果と比較します。比較のために、両方のキャリブレーション を用いて、約 9 µg/mL の濃度のカフェインコントロール サンプル を分析し、評価します。

### サンプル調製メソッド (インジェクタ プログラム)

1260 Infinity II バイアル サンプラ または 1260 Infinity II マルチ サンプラ と 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いて、全容量 100 µL で 5 倍段階希釈します。図 1 に、1260 Infinity II マルチ サンプラ と 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを採用して、カフェイン原液の 5 倍希釈を得るために使用したインジェクタ プログラム を示します。表 1 はプログラムの各ステップを説明しています。

図 1 のインジェクタ プログラム は、1260 Infinity II バイアル サンプラ を 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループと使用した場合も同様に使用できます。

Function	Parameter
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-F1" with default speed using default offset
Draw	Draw 80.00 µL from location "D1F-E1" with default speed using default offset
Draw	Draw 20.00 µL from location "D1F-D1" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-D2" with default speed using default offset
Repeat	Repeat 3 time(s)
Draw	Draw maximum volume from air with default speed
Eject	Eject 80.00 µL to location "D1F-D2" with default speed using default offset
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-F1" with default speed using default offset
End Repeat	End Repeat
Wash	Wash needle as defined in method
Valve	Switch valve to "Mainpass"
Wait	Wait 0.6 min
Valve	Switch valve to "Bypass"

図 1. Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いた 5 倍希釈のためのインジェクタプログラム

表 1. Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いた 5 倍希釈のためのインジェクタプログラムの説明

ステップ		説明	備考
機能	パラメータ		
Eject	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-F1」に最大容量を吐出します	計量デバイスは初期位置に移動します。	位置「D1F-F1」に、空の 2 mL のスクリーバイアル (p/n 5182-0715) を廃液バイアルとして保持します。バイアルにセプタムなしでキャップを付けてキャリーオーバーを防ぎます。
Draw	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-E1」から 80 µL を吸引します	80 µL の希釈液をループに吸引します。	位置「D1F-E1」に、希釈液の入った 2 mL のスクリーバイアル (p/n 5182-0715) を保持します。スリット入りセプタム付きキャップ (p/n 5185-5824) を使用します。
Draw	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-D1」から 20 µL を吸引します。	20 µL のカフェイン原液をループに吸引します。	位置「D1F-D1」に、100 µL のカフェイン原液の入った 400 µL ガラスインサート (p/n 5181-3377) 付き 2 mL スクリューバイアル (p/n 5182-0715) を保持します。スリット入りセプタム付きキャップ (p/n 5185-5824) を使用します。
Wash	ニードルを、メソッドで定義したように洗浄します	ニードルを洗浄してキャリーオーバーを防ぎます。	
Eject	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-D2」に最大容量を吐出します	希釈液およびカフェイン原液を空のバイアルに吐出します	位置「D1F-D2」に、400 µL ガラスインサート (p/n 5181-3377) 付きの空の 2 mL のスクリーバイアル (p/n 5182-0715) を保持します。スリット入りセプタム付きキャップ (p/n 5185-5824) を使用します。
Repeat	3 回繰り返しします		
Draw	デフォルトスピードで、空気を最大容量吸引します。		
Eject	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-D2」に 80 µL を吐出します	カフェイン原液を希釈液と混合します。空気をういて混合します。	
Eject	デフォルトオフセットを使用し、デフォルトスピードで、位置「D1F-F1」に最大容量を吐出します		
End Repeat	繰り返しを終了します		
Wash	ニードルを、メソッドで定義したように洗浄します	ニードルを洗浄してキャリーオーバーを防ぎます。	
Valve	バルブをメインパスに切り替えます		
Wait	0.6 分間待ちます。	次の希釈を実行する前に、ニードルとループをポンプ流量でフラッシュします。	
Valve	バルブをバイパスに切り替えます。		

吸引および吐出スピードの「デフォルト」は測定メソッドの値を使用していることに留意してください。同様に、ニードル高さオフセットの「デフォルト」も測定メソッドの設定値を使用しています。表 2 に、1260 Infinity II バイアルサンプラまたは 1260 Infinity II マルチサンプラを 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループと使用するカフェイン分析の測定メソッドを示します。

1 つのサンプル調製メソッド内で図 1 のインジェクタプログラムを 7 回繰り返し、カフェイン原液の 7 つの 5 倍段階希釈液を調整します。インジェクションプログラムの繰り返しにおいて、原液および目的のバイアル位置は連続的に変更されます。図 2 に、カフェインキャリブレーション標準およびコントロールサンプルの調製と分析に使用されるシーケンスを示します。1 つのインジェクタプログラム内で 7 回希釈を実行し、調製されたキャリブレーション標準を続けて分析します。

表 2. Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラまたは Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いた、カフェイン分析用の測定メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル
グラジエント	0.00 分 5 % B 3.00 分 50 % B 3.10 分 90 % B ストップタイム：4 分 ポストタイム：3 分
流量	0.500 mL/min
温度	40 °C
検出	273 nm/4 nm、リファレンス 360 nm/100 nm 20 Hz
注入	<b>Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ</b>
	注入量：5 µL サンプリング速度：吸引速度：200 µL/min、吐出速度：400 µL/min (デフォルト値) ニードル高さ位置：オフセット 0.0 mm サンプル温度：8 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (50/50) で 3 秒
	<b>Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ</b>
	注入量：5 µL サンプリング速度：吸引速度：100 µL/min、吐出速度：400 µL/min (デフォルト値) ニードル高さ位置：バイアルボトムセンシング使用、オフセット -1.0 mm サンプル温度：8 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (50/50) で 3 秒

☐	☑	Action	Vial	Sample type	Level	Acq. method	Volume	Sample name	Data file	Sample prep method
	☑	Inject	D1F-C1	Blank		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Blank	<S> <001>	
	☑	Inject	D1F-C1	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Injector Program	<S> <002>	Dilution_Sampler_MLS_Final.smx
	☑	Inject	D1F-C1	Blank		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Blank	<S> <003>	
	☑	Inject	D1F-D8	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 0.001	<S> <004>	
	☑	Inject	D1F-D7	Cal. Std.	1	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 0.007	<S> <005>	
	☑	Inject	D1F-D6	Cal. Std.	2	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 0.036	<S> <006>	
	☑	Inject	D1F-D5	Cal. Std.	3	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 0.18	<S> <007>	
	☑	Inject	D1F-D4	Cal. Std.	4	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 0.89	<S> <008>	
	☑	Inject	D1F-D3	Cal. Std.	5	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 4.45	<S> <009>	
	☑	Inject	D1F-D2	Cal. Std.	6	Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 22.26	<S> <010>	
	☑	Inject	D1F-D1	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine 111.3	<S> <011>	
	☑	Inject	D1F-C1	Blank		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Blank	<S> <012>	
	☑	Inject	D1F-B1	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine Control	<S> <013>	
	☑	Inject	D1F-B1	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine Control	<S> <014>	
	☑	Inject	D1F-B1	Sample		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Caffeine Control	<S> <015>	
	☑	Inject	D1F-C1	Blank		Caffeine_gradient.amx	Use Method	Blank	<S> <016>	

図 2. カフェインキャリブレーション溶液とコントロールサンプルの調製および分析における、Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いたシーケンス

1260 Infinity II マルチサンプラと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループを用いて、全容量を 900 µL に増やして 5 倍段階希釈を実行できます。図 3 に、カフェイン原液から全容量 900 µL を用いて 5 倍希釈を得るために使用するインジェクタプログラムを示します。プログラムの個々のステップは表 1 で説明したものと同じですが、より大きな容量が使用され、バイアルはインサートなしで使用します。

表 3 に、1260 Infinity II マルチサンプラと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループを使用したカフェイン分析用の測定メソッドを示します。希釈間で 900 µL ループのフラッシュを高速化できるように、より高い流量を選択しました。それに応じてカラムと注入容量を選択しました。

Function	Parameter
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-F1" with default speed using default offset
Draw	Draw 720.00 µL from location "D1F-E1" with default speed using default offset
Draw	Draw 180.00 µL from location "D1F-D1" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-D2" with default speed using default offset
Repeat	Repeat 3 time(s)
Draw	Draw maximum volume from air with default speed
Eject	Eject 720.00 µL to location "D1F-D2" with default speed using default offset
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-F1" with default speed using default offset
End Repeat	End Repeat
Wash	Wash needle as defined in method
Valve	Switch valve to "Mainpass"
Wait	Wait 1.13 min
Valve	Switch valve to "Bypass"

図 3. Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループを用いた 5 倍希釈のためのインジェクタプログラム

表 3. Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループを用いたカフェイン分析用の測定メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 50 mm、2.7 µm
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル
グラジエント	0.00 分 5 % B 3.00 分 50 % B 3.10 分 90 % B ストップタイム：5 分 ポストタイム：4 分
流量	2.400 mL/min
温度	40 °C
検出	273 nm/4 nm、リファレンス 360 nm/100 nm 20 Hz
注入	<b>Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループ</b>
	注入量：24 µL サンプリング速度：吸引速度：450 µL/min、吐出速度：1500 µL/min (デフォルト値よりも低速) ニードル高さ位置：バイアルボトムセンシング使用、オフセット：-1.0 mm サンプル温度：8 °C ニードル洗浄：水/アセトニトリル (50/50) で 3 秒

## 結果と考察

インジェクタプログラムを用いたキャリブレーション溶液の調製を、カフェインサンプルを用いて行いました。オートサンブラで調製したキャリブレーション溶液の分析から得た結果を、手作業で調製したキャリブレーション溶液から得た分析結果と比較しました。比較はカフェインコントロールサンプルを用いて、両方のキャリブレーションで分析および評価しました。

例として、図 4 に、1260 Infinity II マルチサンブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループを使用して調製した、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カフェインキャリブレーション溶液の分析を示します。

1260 Infinity II マルチサンブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループを使用して調整し、0.006 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲の濃度のカフェインキャリブレーション溶液を分析して得られた検量線は、優れた直線性を示しています (図 5 を参照)。1260 Infinity II マルチサン

ブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループによって調製したキャリブレーション溶液を使用した場合と、手作業で調製したキャリブレーション溶液を使用した場合のカフェインコントロールサンプルの定量化では、1.08 % という非常に小さい偏差が示されています。手作業でのキャリブレーション溶液調製においてピペットが正しく操作され使用されたものと仮定すると、この小さな偏差は、1260 Infinity II マルチサンブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループによって調製された希釈が

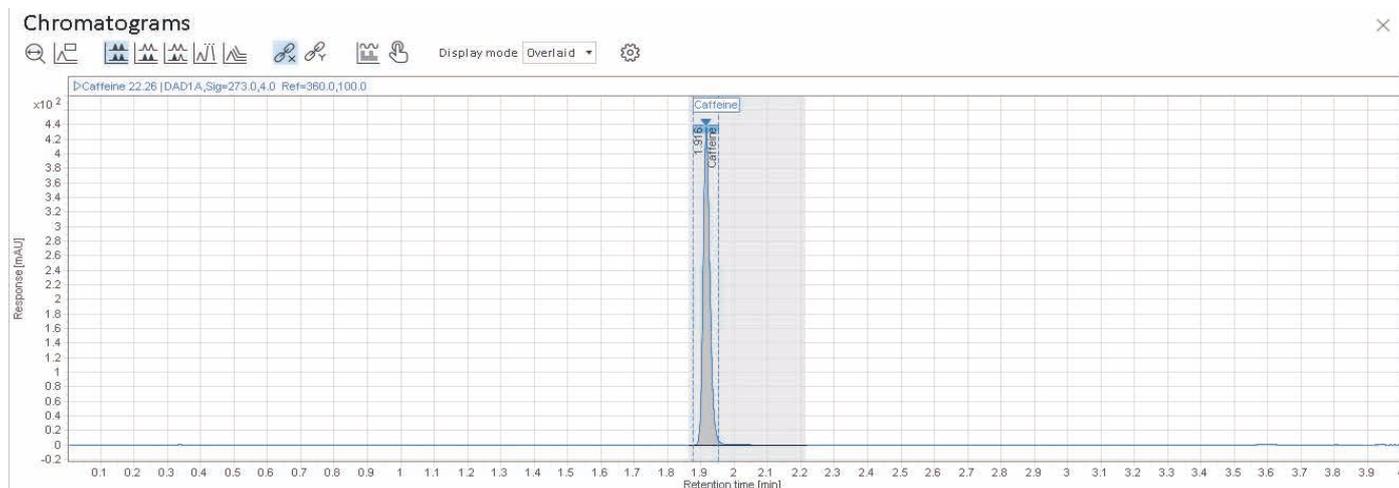


図 4. Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループを用いて調製した、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カフェインキャリブレーション溶液の分析

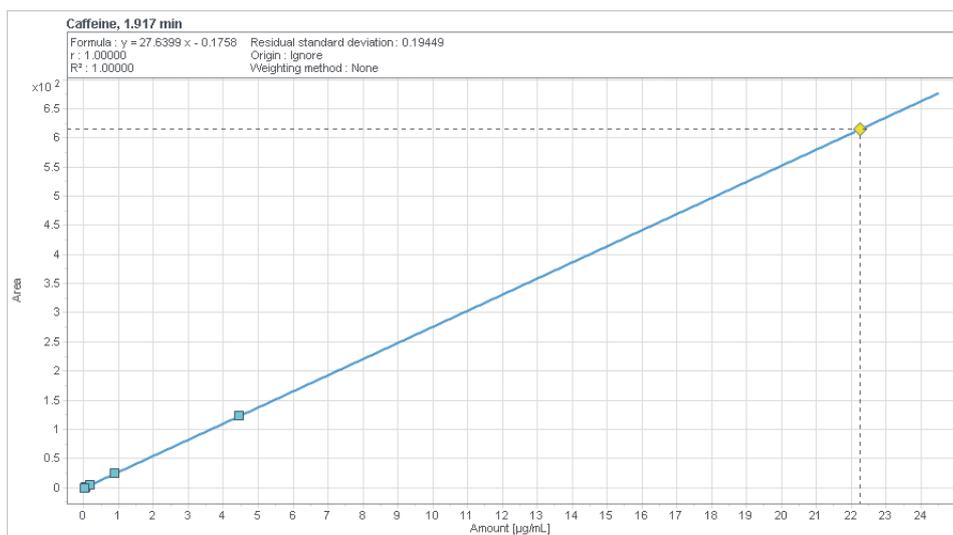


図 5. Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラと 100  $\mu\text{L}$  分析ヘッドおよび 100  $\mu\text{L}$  ループを用いて調製した、0.006 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカフェインキャリブレーション溶液の分析から得た検量線

正しいものであることを示しています。手作業によるキャリブレーション溶液調製中に不適切にピペティングされると、手作業で調製したキャリブレーション溶液は不正確なキャリブレーション結果につながることもあり、偏差が大きくなります。

表 4 は、手作業、または、1260 Infinity II バイアルサンプルまたは 1260 Infinity II マルチサンプルの 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ付き、または 1260 Infinity II マルチサンプルの 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループ付きで調製したキャリブレーション溶液を使用して得られた、カフェインキャリブレーションをまとめたものです。特にオートサンプルで調製したキャリブレーション溶液を使用することにより、優れた直線性が得られました。さらに、キャリブレーション式がきわめて類似

しています。つまり、カフェインコントロールサンプルの定量化において、手作業とオートサンプルで調製されたキャリブレーション溶液との間で良好な一致が得られます。

LOD および LOQ を得るために、オートサンプルによる追加の段階希釈を用いることができます。分析手順の LOD は、検出可能なサンプル中の分析対象物の最低量として定義されますが、必ずしも正確な値として定量されるものではありません。S/N 比に基づく LOD を得る場合、3:1 または 2:1 のどちらかの S/N 比を許容できるものと一般的にみなします。<sup>1</sup> 段階希釈されたカフェイン溶液を分析することで、カフェインピークの S/N 比に基づいた LOD に最も近い濃度の測定が可能になります。

図 6 に、1260 Infinity II マルチサンプルと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを採用して、100 µg/mL カフェイン原液から段階 5 倍希釈して調製された 0.001 µg/mL カフェイン溶液の分析結果を示します。クロマトグラムの挿入図に、Injection Results としてカフェインピークの特性が示されています。カフェインピークは 2.5 の S/N 比を示しているため、カフェイン測定の LOD は 0.001 µg/mL であることが示されました。

本技術概要では、インジェクタプログラムを用いたキャリブレーション溶液の調製を、1260 Infinity II バイアルサンプルおよび 1260 Infinity II マルチサンプルを用いて説明しました。インジェクタプログラムは、他の Agilent オートサンプルでも使用できます。キャリブレーション溶液の調製に合わせて、搭載する分析ヘッドおよびループを検討する必要があります。

表 4. 手作業およびオートサンプルで調製したキャリブレーション溶液によるカフェインのキャリブレーション

オートサンプル	キャリブレーション方法	キャリブレーション式	相関係数 R <sup>2</sup>	コントロールサンプル偏差 (%)
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプルと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ	手作業	y=27.85*x+0.53	0.99999	1.08
	オートサンプル	y=27.64*x-0.18	1.00000	
Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプルと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループ	手作業	y=27.76*x+0.43	0.99999	0.79
	オートサンプル	y=27.65*x-0.73	0.99999	
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプルと 900 µL 分析ヘッドおよび 900 µL ループ	手作業	y=27.69*x+0.54	0.99999	0.72
	オートサンプル	y=27.53*x+0.02	1.00000	



図 6. LOD 値：Agilent 1260 Infinity II マルチサンプルと 100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL ループを用いて、100 µg/mL カフェイン原液から 5 段階希釈して調製された 0.001 µg/mL カフェイン溶液の分析

## 結論

1260 Infinity II バイアルサンプラや 1260 Infinity II マルチサンプラなどの Agilent オートサンプラでは、インジェクタプログラムを使用して、キャリブレーション溶液と標準希釈液を調整し、LOD と LOQ を求めることができます。これにより、手作業での分注手順を回避できるため、時間と費用の削減が可能となります。また、得られた結果はオペレータのスキルに左右されません。オートサンプラで調製したキャリブレーション溶液を使用すると、キャリブレーションで優れた直線性が得られます。さらに、手作業とオートサンプラで調製されたキャリブレーション溶液との間で、コントロールサンプルの定量化において良好な一致が得られます。

## 参考文献

1. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline, VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1), October 27, 1994. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf) (accessed December 2, 2019).

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Printed in Japan, January 22, 2020  
5994-1704JAJP  
DE.4342939815