

4 資 審 第 14 号
令和4年7月 29 日

農林水産大臣 金子 原二郎 殿

農業資材審議会長 赤松 美紀

組換え DNA 技術応用飼料添加物の安全性に関する確認に係る諮問について（答申）

令和3年11月9日付け3消安第4198号をもって諮問のあった標記の件について、下記のとおり答申する。

記

次に掲げる組換え DNA 技術応用飼料添加物について、安全性に問題がないとすることは適当と認める。

- ・ *Komagataella phaffii* BSY0007 株を利用して生産されたフィターゼ

4 資 審 第 14 号
令和4年7月 29 日

農林水産大臣 金子 原二郎 殿

農業資材審議会長 赤松 美紀

組換え DNA 技術応用飼料添加物の安全性に関する確認に係る諮問について（答申）

令和4年2月8日付け3消安第5843号をもって諮問のあった標記の件について、下記
のとおり答申する。

記

次に掲げる組換え DNA 技術応用飼料添加物について、安全性に問題がないとする
ことは適当と認める。

- ・ *Trichoderma reesei* RF8694 株を利用して生産されたフィターゼ

4 資 審 第 15 号
令和4年7月29日

農林水産大臣 金子 原二郎 殿

農業資材審議会長 赤松 美紀

飼料添加物の製造の方法等の基準及び成分の規格の設定等に係る諮問について
(答申)

令和4年3月8日付け3消安第6608号をもって諮問のあった標記の件について、下記
のとおり答申する。

記

法第3条第1項の規定に基づき定められたフィターゼの製造方法等の基準及び成分
の規格について、遺伝子組換え技術によって得られた以下のものを飼料添加物として
製造等することができるよう、当該基準及び成分の規格を別紙1及び別紙2のとおり
改正することは適当と認める。

- ・ *Komagataella phaffii* から産生されるフィターゼ
- ・ *Trichoderma reesei* から産生されるフィターゼ

フィターゼについて、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）において次の事項を基準及び成分の規格として定めること（下線部が改正部分）。

1. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準
飼料一般の製造方法の基準

フィターゼ（その 2 の（7））は、豚、鶏、うずらを対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

2. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

フィターゼ（その 2 の（7））

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 150,000 フィチン酸分解力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、帯緑褐色の液体である。
- ② 本品の水溶液（1→100）の pH は、4.0～5.0 である。
- ③ 本品は、pH 2.5～5.5 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 1.0 g（0.95～1.04 g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第 1 法）により鉛の試験を行うとき、その量は、5 µg/g 以下でなければならない。このとき、鉛標準液は、0.5 mL を全量ピペットを用いて量り、10 mL の全量フラスコに入れ、硝酸（1→150）を標線まで加えて 10 mL とし、標準液とする。
- ② ヒ素 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験②を準用する。
- ③ 抗菌活性 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験③を準用する。

強熱残分 5.0% 以下（0.5 g）

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 4 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 0.5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、
100 mL の全量フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L
酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 80 mL を加え、回転子を用いて室温で
30 分間攪拌した後、回転子を取り出し、同緩衝液を標線まで加えて 100
mL とし、試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用い
て量り、1 mL あたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように
同緩衝液を加え正確に希釈し、試料溶液とする。

(イ) 製造の方法の基準

Komagataella phaffii に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を
培養し、培養を終了した後、培養物をろ過して菌体を除去し、さらに、ろ液
を濃縮して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(エ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数
点以下第 1 位まで）を記載すること。

イ 製剤（その 1 液状）

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体に安息香酸ナトリウムを
加えた後、塩酸を用いて pH を調整し、必要に応じて水及びグリセリンを混
和した水溶性液状物である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の
85～170%を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 4 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 1 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、
100 mL の全量フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L
酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 80 mL を加え、回転子を用いて室温で
30 分間攪拌した後、回転子を取り出し、同緩衝液を標線まで加えて 100
mL とし、試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用い

て量り、1 mLあたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え正確に希釈し、試料溶液とする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤（その 2）

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体を噴霧乾燥した後、小麦粉及び α -デンプンを加えた粉末又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の 85～170%を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 4 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 1 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の三角フラスコに入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 100 mL を加え、回転子を用いて室温で 30 分間攪拌した後、約 2 mL を 11,000×g で 3 分間遠心分離し、得られた上澄液を試料原液とする。この試料原液適量をマイクロピペットを用いて量り、1 mL あたりの濃度が約 0.1 フィチン酸分解力単位となるように同緩衝液を加え正確に希釈し、試料溶液とする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体の表示の基準を準用する。

エ 製剤（その 3）

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ（その 2 の（7））製造用原体に、小麦粉を加えて乾燥した後、植物油及びグリセリン脂肪酸エステルで被覆し、必要に応じてもみがらを加えた小片又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の

85～170%を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第4法により試験を行う。

試料溶液の調製 フィターゼ（その2の（7））製剤（その2）の酵素力試験を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その2の（7））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

フィターゼ（その2の（7））製造用原体の表示の基準を準用する。

3. 飼料添加物一般の試験法

(14) 酵素力試験法

⑧ フィチン酸分解力試験法

(IV) 第4法

基質溶液の調製

あらかじめフィチン酸ナトリウムをデシケーター（シリカゲル）中で24時間以上乾燥し、その2.00 g（1.95～2.04 g）を量り、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）200 mLを加えて溶解し、6 mol/L 塩酸でpHを5.5に調整した後、250 mLの全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて250 mLとする。

反応停止発色液の調製

モリブデン酸アンモニウム 100.0 g（99.95～100.04 g）に水を加えて溶かし、25%アンモニア水 10 mLを加えた後、水を加えて1,000 mLとし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。バナジン酸アンモニウム 2.35 g（2.345～2.354 g）に50～60 °Cに温めた水 400 mLを加えて溶かし、硝酸（1→3）20 mLを加え、更に水を加えて1,000 mLとし、バナジン酸アンモニウム試液とする。

モリブデン酸アンモニウム試液1容量に、バナジン酸アンモニウム試液1容量及び硝酸（1→3）2容量を加え、混合する。反応停止発色液は用時調製する。

操作法

試料溶液は、各条で規定する方法で調製する。試料溶液 0.1 mLをマイクロピペットを用いて量り、12×150 mmの試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）0.3 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、37±0.5 °Cに加温し、5分間放置する。この試料溶液に、あらかじめ37±0.5 °Cに加温した基質溶液 0.8 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、37±0.5 °Cで正確に30分間放置する。その後、反応停止発色液 0.8 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、試験反応溶液とする。

別に試料溶液 0.1 mLをマイクロピペットを用いて量り、12×150 mmの試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液（pH 5.5）0.3 mLをマイクロピペットを用いて加え混合し、37±0.5 °Cに加温し、5分間放置する。この試料溶液に反応停止発色液 0.8 mLをマイクロピペットを用いて加え、さらにあらか

じめ 37±0.5 °C に加温した基質溶液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加え混合し、試験対照溶液とする。

試験反応溶液及び試験対照溶液を室温で 10 分間放置した後、11,000×g で 3 分間遠心分離を行い、得られた上澄液につき、水を対照液として波長 415 nm における吸光度 OD_T 及び OD_{TB} を測定する。

1 g 中のフィチン酸分解力単位

$$\underline{=(OD_T - OD_{TB}) \times F \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{W} \times Z}$$

OD_T : 試験反応溶液の平均吸光度

OD_{TB} : 試験対照溶液の平均吸光度

Z : 希釈倍率

F : 検量線から求めた吸光度差 1 に対応するリン酸イオン濃度 (μmol/mL)

W : 試料採取量 (g)

検量線の作成

リン酸二水素カリウム約 10 g を 105 °C で 2 時間乾燥させた後、デシケーターで保存し、その 0.682 g (0.6715~0.6824 g) を量り、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) を加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、さらに同緩衝液を標線まで加えて 100 mL としたものを標準原液とする。

標準原液を順次水で正確に 2 倍、4 倍、8 倍及び 16 倍に希釈し、標準液とする。

各標準溶液 0.04 mL をマイクロピペットを用いて量り、12×150mm の試験管に入れ、ポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 0.36 mL をマイクロピペットを用いて加え混合した後、基質溶液 0.8 mL 及び反応停止発色液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加え混合したものを、リン酸標準反応溶液とする。リン酸標準反応溶液を室温で 10 分間放置した後、11,000×g で 3 分間遠心分離を行い、得られた上澄液につき、水を対照液として波長 415nm における吸光度 OD_{S1}、OD_{S2}、OD_{S3} 及び OD_{S4} を測定する。

別にポリソルベート 20 添加(0.01%)0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5) 0.4 mL をマイクロピペットを用いて量り、12×150mm

の試験管に入れ、基質溶液 0.8 mL 及び反応停止発色液 0.8 mL をマイクロピペットを用いて加えて混合したものを、リン酸標準対照溶液とする。リン酸標準対照溶液を室温で 10 分間放置した後、 $11,000\times g$ で 3 分間遠心分離を行い、得られた上澄液につき、水を対照液として波長 415 nm における吸光度 OD_B を測定する。

リン酸濃度を縦軸に、測定したリン酸標準反応溶液とリン酸標準対照溶液の吸光度差 ($OD_{S1}-OD_B$)、($OD_{S2}-OD_B$)、($OD_{S3}-OD_B$) 及び ($OD_{S4}-OD_B$) を横軸にとり、検量線を作成する。

4. 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析法標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

(2) 試薬・試液

(削除)

- 0.25 mol/L 酢酸塩酸緩衝液：酢酸ナトリウム 34.02g (34.015~34.024g) に水を加えて溶かし、塩酸で pH を 5.5 に調整し、水を加えて 1,000mL とする。
(追加)
- 0.25 mol/L 酢酸ナトリウム塩酸混液 (pH 5.5)：酢酸ナトリウム 34.02g (34.015~34.024g) に水を加えて溶かし、塩酸で pH を 5.5 に調整し、水を加えて 1,000mL とする。

フィターゼについて、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）において次の事項を基準及び成分の規格として定めること（下線部が改正部分）。

1. 飼料一般の成分規格並びに製造、使用及び保存の方法及び表示の基準

飼料一般の製造方法の基準

フィターゼ（その 2 の（8））は、豚、鶏、うずら、魚類及び甲殻類を対象とする飼料（飼料を製造するための原料又は材料を含む。）以外の飼料に用いてはならない。

2. 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

フィターゼ（その 2 の（8））

ア 製造用原体

(ア) 成分規格

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、1 g 中に 50,000 フィチン酸分解力単位以上を含む。

物理的・化学的性質

- ① 本品は、褐色の液体である。
- ② 本品の懸濁液（1→100）の pH は、4.0～5.0 である。
- ③ 本品は、pH 3.5～5.0 において最大の酵素活性を有する。

純度試験

- ① 鉛 本品 2.0 g（1.95～2.04 g）を量り、鉛試験法（原子吸光光度法第 1 法）により鉛の試験を行うとき、その量は、5 μ g/g 以下でなければならない。
- ② ヒ素 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験②を準用する。
- ③ 抗菌活性 フィターゼ（その 1）製造用原体の純度試験③を準用する。

強熱残分 5.0 %以下（0.5 g）

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 5 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 0.25 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、酢酸ナトリウム緩衝液(0.25 mol/L、pH 5.5)で 25 mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.4～1.1 の範囲になるように同緩衝液で希釈し、試料溶液とする。

(イ) 製造の方法の基準

Trichoderma reesei に属する菌株を宿主としたフィターゼ生産組換え体を培養し、培養を終了した後、培養液をろ過し、菌体を除去して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

遮光した密閉容器に保存すること。

(エ) 表示の基準

本品の直接の容器又は直接の被包に、最大の酵素活性を示す pH 値（小数点以下第 1 位まで）を記載すること

イ 製剤（その 1 液状）

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体に、安息香酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、ソルビトール及び硫酸ナトリウムを加え、精製水で希釈した水溶性液状物である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の 85～170 %を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 5 法により試験を行う。

試料溶液の調製 フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体の酵素力試験を準用する。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体の表示の基準を準用する。

ウ 製剤（その 2）

(ア) 成分規格

本品は、フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体を噴霧乾燥し、必要に応じて小麦粉及び植物油を混和、あるいは、フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体に小麦粉、植物油、抗酸化剤及びプロピオン酸を加え、顆粒化した後、乾燥させた小片、粉末又は粒子である。

酵素力単位 本品は、酵素力試験を行うとき、表示フィチン酸分解力単位の 85～170 %を含む。

酵素力試験 フィチン酸分解力試験法第 5 法により試験を行う。

試料溶液の調製 本品 0.5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、酢酸ナトリウム緩衝液(0.25 mol/L、pH 5.5)を加え、室温で 20 分間攪拌した後、同緩衝

液で 50 mL とする。この溶液を試験反応溶液と試験対照溶液の吸光度差が 0.4～1.1 の範囲になるように同緩衝液で希釈し、試料溶液とする。

(イ) 保存の方法の基準

フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体の保存の方法の基準を準用する。

(ウ) 表示の基準

フィターゼ（その 2 の（8））製造用原体の表示の基準を準用する。

3. 飼料添加物一般の試験法

(14) 酵素力試験法

⑧ フィチン酸分解力試験法

(v) 第5法

基質溶液の調製

フィチン酸ナトリウム 0.98 g (0.975~0.984 g) を量り、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) 約 80 mL を加えて溶かし、酢酸で pH を 5.5 に調整した後、100 mL の全量フラスコに入れ、同緩衝液を標線まで加えて 100 mL とする。

反応停止発色液の調製

モリブデン酸アンモニウム 20 g (19.5~20.4 g) を水 180 mL に溶かし、アンモニア水 2 mL を加えた後、水で 200 mL とし、モリブデン酸アンモニウム試液を調製する。バナジン酸アンモニウム 0.47 g (0.465~0.474 g) に水 160 mL を加え、水浴中で攪拌しながら約 50 °C に加温して溶かした後、硝酸 (175→500) 4 mL を加え、室温まで冷却した後、水で 200 mL とし、バナジン酸アンモニウム試液を調製する。モリブデン酸アンモニウム原液 25 mL に、バナジン酸アンモニウム試液 25 mL を加え、よく振り混ぜ、硝酸 (175→500) 16.5 mL を加えた後、水で 100 mL とする。反応停止発色液は用時調製する。

操作法

試料溶液は、各条で規定する方法で調製する。基質溶液 2 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、37±0.5 °C に加温し、5~10 分間放置する。この基質溶液に、別に、37±0.5 °C に加温し、5~10 分間放置した試料溶液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、37±0.5 °C で正確に 60 分間放置する。その後、反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500×g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を試験反応溶液とする。この溶液につき、水を対照液として、波長 415 nm における吸光度 OD_T を測定する。別に、基質溶液 2 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、これに反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、かき混ぜた後、試料溶液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500×g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を試験対照溶液とする。この溶液につき、水を対照液として、波長 415 nm における吸光度 OD_B を測定する。

$$1 \text{ g 中のフィチン酸分解力単位} = (\text{OD}_T - \text{OD}_B) \times F \times V \times 1/60 \times 1/W \times Z$$

F : 検量線から求めた吸光度差 1 に対応するリン酸イオン濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)

V : 試料溶液の定容量 (mL)

W : 試料採取量 (g)

Z : 希釈倍率

検量線の作成

105 °C で 2 時間乾燥させた後、デシケーターで保存したリン酸二水素カリウム 0.0980 g (0.0975~0.0984 g) を量り、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) を加えて溶かし、100 mL の全量フラスコに入れ、更に酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) を標線まで加えて 100 mL とした後、pH 5.5 であることを確認し、7.20 $\mu\text{mol/mL}$ 標準原液を調製する。

標準原液の一定量をそれぞれ試験管に入れ、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) で正確に 1.25 倍、2.5 倍、5 倍及び 10 倍に希釈し、標準液 S1、S2、S3 及び S4 を調製する。

各標準液 1 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、基質溶液 2 mL 及び反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500 \times g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液をリン酸標準反応溶液とする。試験反応液と同様に操作法に従い、 OD_{S1} 、 OD_{S2} 、 OD_{S3} 、 OD_{S4} を測定する。

別に、酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5) 1 mL を全量ピペットを用いて量り、15 mL プラスチック製遠心沈殿管に入れ、基質溶液 2 mL 及び反応停止発色液 2 mL を全量ピペットを用いて加え、よくかき混ぜ、室温で 20 分間放置し、さらに 2,500 \times g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液をリン酸標準対照溶液とする。試験反応液と同様に操作法に従い、 OD_{SB} を測定する。

リン酸イオン濃度を縦軸に、測定した OD_{SB} との吸光度差 ($\text{OD}_{\text{S1}} - \text{OD}_{\text{SB}}$)、 $(\text{OD}_{\text{S2}} - \text{OD}_{\text{SB}})$ 、 $(\text{OD}_{\text{S3}} - \text{OD}_{\text{SB}})$ 、 $(\text{OD}_{\text{S4}} - \text{OD}_{\text{SB}})$ を横軸にとり、検量線を作成する。

4. 飼料添加物一般の試験法並びに各飼料添加物の成分規格及び製造方法等の基準に用いる標準品、試薬・試液、容量分析法標準液、標準液、色の比較液、計量器・用器、ろ紙、滅菌法及びベルトラン糖類定量表の規定

(2) 試薬・試液

酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 mol/L、pH 5.5)

酢酸ナトリウム 30.02 g (30.015~30.024 g) に水約 900 mL を加えて溶かし、氷酢酸 1.68 mL をマイクロピペットを用いて加え、塩化カルシウム 0.147 g (0.1465~0.1474 g) を加え、さらにポリソルベート 20 試液 1 mL を全量ピペットを用いて加え、1 mol/L 酢酸試液又は 1 mol/L 水酸化ナトリウム試液を用いて pH を 5.5 に調整した後、水を加えて 1,000 mL とする。

ポリソルベート 20 試液

ポリソルベート 20 5 mL に水を加えて溶かし、50 mL とする。

酢酸試液、1 mol/L

氷酢酸 12 g (11.5~12.4 g) に水を加えて溶かし、200 mL とする。