

RÉSOLUTION OIV-OENO 600-2018

DOSAGE DES D-GLUCOSE ET D-FRUCTOSE DANS LES VINS PAR METHODE ENZYMATIQUE AUTOMATISEE

*AVERTISSEMENT : cette résolution amende la résolution suivante :
- OIV-OENO 391-2010*

(Méthode de type III)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONFORMEMENT à l'article 2, paragraphe 2 iv de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

CONSIDÉRANT l'intérêt exprimé par certains experts de la SCMA d'inclure les méthodes automatiques dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*

DECIDE de supprimer l'exemple pratique concernant l'analyte dans la résolution OIV-OENO 391-2010 au fur et à mesure qu'une méthode automatique concernant le même analyte est adoptée.

DÉCIDE de compléter le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* avec la méthode suivante :

Dosage des D-glucose et D-fructose dans les vins par méthode enzymatique automatisée

Méthode de type III

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de la somme D-glucose + D-fructose dans les vins par analyse enzymatique spécifique en utilisant un analyseur automatique séquentiel.

Dans le présent document l'étude collaborative a permis de caractériser la méthode sur une échelle de mesure de 0,1 à 96,31 g/L, en prenant en compte l'introduction d'une dilution de l'échantillon au-delà de 5 g/L.

Note : Le cas échéant, il appartient à chaque laboratoire utilisant cette méthode de

redéfinir, éventuellement en l'élargissant, ce domaine par un travail de validation.

2. Références normatives

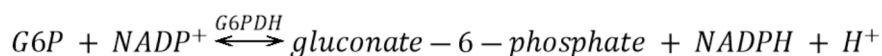
- Recueil des méthodes internationales d'analyses - OIV: Glucose et Fructose (méthode enzymatique) OIV-MA-AS311-02
- ISO 78-2 : Chimie - Plans de normes

3. Principes réactionnels

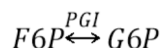
Le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) lors d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) pour produire du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P)



Le glucose-6-phosphate est d'abord oxydé en gluconate-6-phosphate par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La quantité produite de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) est directement corrélée avec celle de glucose-6-phosphate et donc avec celle de D-glucose.



Le fructose-6-phosphate (F6P) est transformé en glucose-6-phosphate (G6P) en présence de phosphoglucose isomerase (PGI) :



Le glucose-6-phosphate ainsi formé réagit selon le schéma précédent.

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite produite (NADPH) est mesurée grâce à son absorption à 340 nm.

4. Réactifs et solutions de travail

Au cours de l'analyse, sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1. Réactifs

4.1.1. Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité I ou II.

4.1.2. Triéthanolamine hydrochloride ; (CAS 637-39-8)

4.1.3. NADP (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) ; (CAS 24292-60-2)

4.1.4. ATP (adenosine-5'-triphosphate) ; (CAS 34369-07-8)

4.1.5. MgSO₄ (sulfate de magnésium anhydre) ; (CAS 7487-88-9)

4.1.6. Hydroxyde de sodium ; (CAS 1310-73-2)

4.1.7. Hexokinase (HK) ; (CAS 9001-51-8)

4.1.8. Glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6P-DH) ; (CAS 9001-40-5)

4.1.9. Phosphoglucose isomerase (PGI): lyophilized powder, 400-600 unités/mg protein ; (CAS 9001-41-6)

Note : Une unité assure la conversion de 1.0 μ mole de D-fructose 6-phosphate en D-glucose 6-phosphate par minute à pH 7.4 et 25 °C.

4.1.10. Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (CAS 9003-39-8)

4.1.11. D-glucose : Pureté $\geq$ 99.5% ; (CAS 50-99-7)

4.1.12. D-fructose : Pureté $\geq$ 99% ; (CAS 57-48-7)

Remarque 1 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination du D-glucose et du D-fructose. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que ceux-ci comprennent bien les réactifs indiqués ci-dessus.

Remarque 2 : L'utilisation de PVP est recommandée pour éliminer une éventuelle action négative des tanins du vin sur les molécules protéiques des enzymes. C'est le cas notamment dans des vins rouges. Dans le cas où l'utilisation de PVP n'est pas effective, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

Solutions de travail

4.2.1. Tampon triéthanolamine hydrochloride et sulfate de magnésium ajusté à pH 7,6.

La préparation peut être la suivante :

- Triéthanolamine hydrochloride (4.1.2) : 11,2 g
- Sulfate de magnésium (4.1.5) : 0,2 g
- PVP (4.1.10) : 2 g
- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 150 mL

Le mélange est ajusté à pH 7,6 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5M puis complété à 200 mL avec de l'eau pour usage analytique. Le tampon se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.2. Solution de travail R1 (exemple) :

- Tampon triéthanolamine (4.2.1) : 50 mL
- NADP (4.1.3) : 117 mg
- ATP : (4.1.4) 150 mg

4.2.3. Solution de travail R2 (exemple) :

- Tampon triéthanolamine (4.2.1) : 2 mL
- HK (4.1.7) : 270 U
- G6P-DH (4.1.8) : 340 U
- PGI (4.1.9) : 640 U

Note : Des préparations commerciales de mélange HK/6GPDH peuvent être utilisées.

Remarque : Lors de la préparation de ces solutions, le mélange doit être effectué en douceur pour éviter la formation de mousse. La durée de vie des solutions de travail est limitée et doit être évaluée et respectée par le laboratoire.

4.2. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au Système International d'Unité (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures de D-glucose et D-Fructose préparées par pesée et couvrant la gamme de mesure.

5. Appareillage

5.1. Analyseur

5.1.1. Type de matériel

Analyseur automatique séquentiel équipé d'un spectrophotomètre avec détecteur UV. La température de réaction doit être stable (environ 37°C). Les cuvettes de réaction sont en verre, en méthacrylate ou en quartz. L'équipement est piloté par un logiciel assurant son fonctionnement, l'acquisition des données et les calculs utiles.

5.1.2. Lecture des absorbances

La concentration des analytes est une fonction directe d'une différence d'absorbance lue par le spectrophotomètre. La précision de la lecture d'absorbance doit être au minimum de 0.1 unité d'absorbance (AU). Il est préférable de ne pas utiliser les valeurs d'absorbance supérieures à 2.0.

5.1.3. Précision des volumes prélevés

La précision des volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur a une influence sur le résultat de mesure. Un contrôle qualité des résultats par des stratégies adaptées (par exemple selon les guides publiés à l'OIV) est recommandé.

5.1.4. Durée et température de réaction

En général, le temps de réaction est de 10 minutes et la température de 37°C. Certains appareils peuvent utiliser des valeurs un peu différentes.

5.1.5. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADPH formé par la réaction est de 340 nm. Pour les spectrophotomètres généralement utilisés, cette longueur d'onde sera retenue. Certains analyseurs sont équipés de photomètres utilisant une lampe à la vapeur de mercure. Dans ce cas, il sera retenu une longueur d'onde de lecture de 365 ou 334 nm.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au Système international d'unités et avoir une précision de 1 mg.

5.3. pH-mètre

5.4. Verrerie de mesure

Les verreries de mesure pour la préparation des réactifs et des solutions de calibrage sont de classe A.

6. Echantillonnage

6.1. Préparation des échantillons pour les moûts et les vins

La majorité des échantillons de vins et de moûts peuvent être analysés sans préparation. Dans certains cas une préparation peut être introduite :

- Une filtration doit être utilisée pour les échantillons fortement turbides.
- Une dilution de l'échantillon (manuelle ou automatique) avec de l'eau pour usage analytique (4.1.1) doit être utilisée pour les valeurs supérieures à la gamme de mesure. A titre d'exemple, des facteurs de 10x, 20x ou 40x sont mis en œuvre pour les moûts. Compte tenu de leur incidence sur le budget d'incertitude, ces dilutions doivent être réalisées avec le plus grand soin.

6.2. Préparation des échantillons de vins chargés en CO₂

Les échantillons de vins chargés en CO₂, peuvent produire des effets de bullage. Ils doivent être préalablement dégazés par agitation sous vide, passage aux ultrasons ou tout moyen permettant le dégazage requis.

7. Mode opératoire

Etant donné que des analyseurs différents peuvent être utilisés, il est recommandé que les conditions d'utilisation données par le constructeur soient strictement respectées. Cela est aussi valable pour les différents kits enzymatiques existant sur le marché.

Le mode opératoire se déroule de la façon suivante :

1. L'échantillon (E) est placé dans une cuvette de réaction,
2. La solution de travail R1 (4.2.2) est ensuite introduite dans la cuvette,

3. Une homogénéisation est réalisée. Un temps de latence est alors observé, afin de garantir la stabilité de l'absorbance. Ce temps de latence peut durer de 1 à 5 mn, il est défini par le laboratoire, en fonction des caractéristiques de l'équipement utilisé.
4. La solution de travail R2 (4.2.3) est ajoutée, et la réaction se déclenche.

A titre d'exemple, les quantités des différents éléments peuvent être :

- Echantillon : 2,0 μL
- R1 : 40 μL
- R2 : 40 μL

L'appareil effectue des mesures régulières (par exemple toutes les 12 secondes) qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné en figure 1.

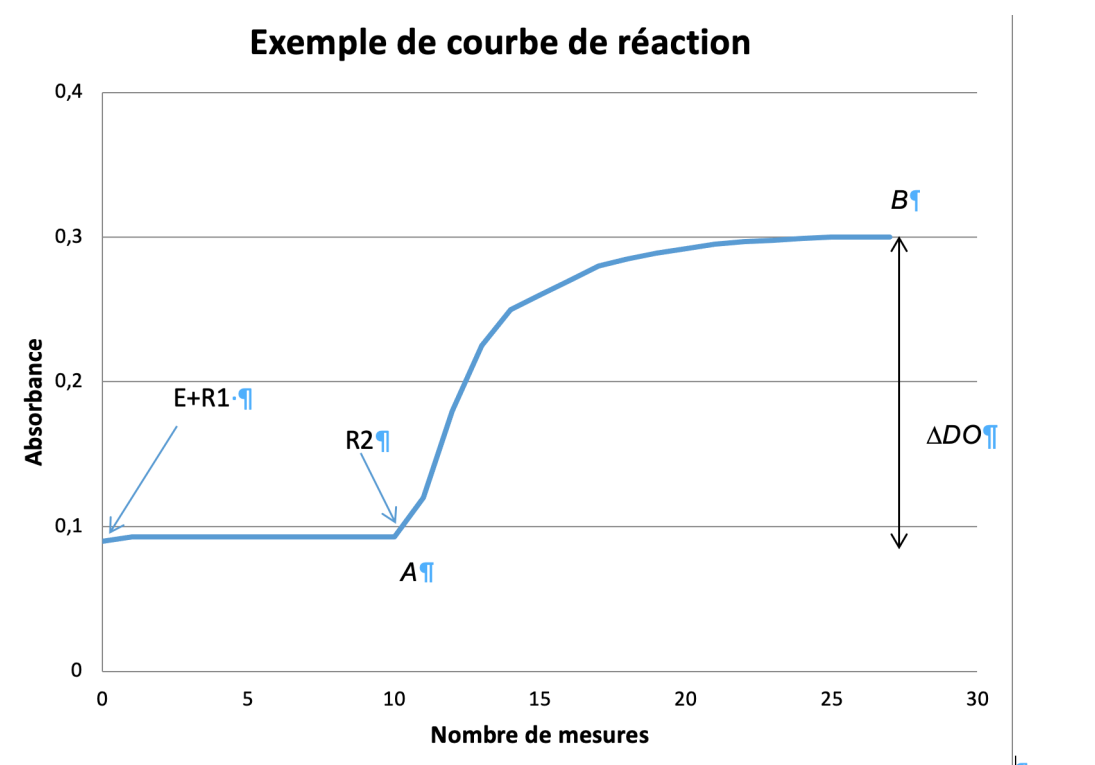


Figure 1 : Courbe de réaction

L'appareil doit permettre de choisir les points de lecture de la différence d'absorbance recherchée, par exemple A et B dans la figure 1.

8. Calculs des résultats

La mesure utilisée pour la détermination du résultat est :

$$\Delta DO = (\text{Absorbance } B - \text{Absorbance } A)$$

Afin de corréliser cette valeur ΔDO à la concentration en D-glucose + D-fructose recherchée, un étalonnage de l'appareil est effectué en utilisant les solutions d'étalonnage (§ 4.3) en 3 points minimum recouvrant la gamme de mesure. Par ailleurs, un blanc réactif est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas d'échantillon (point 0 de l'étalonnage).

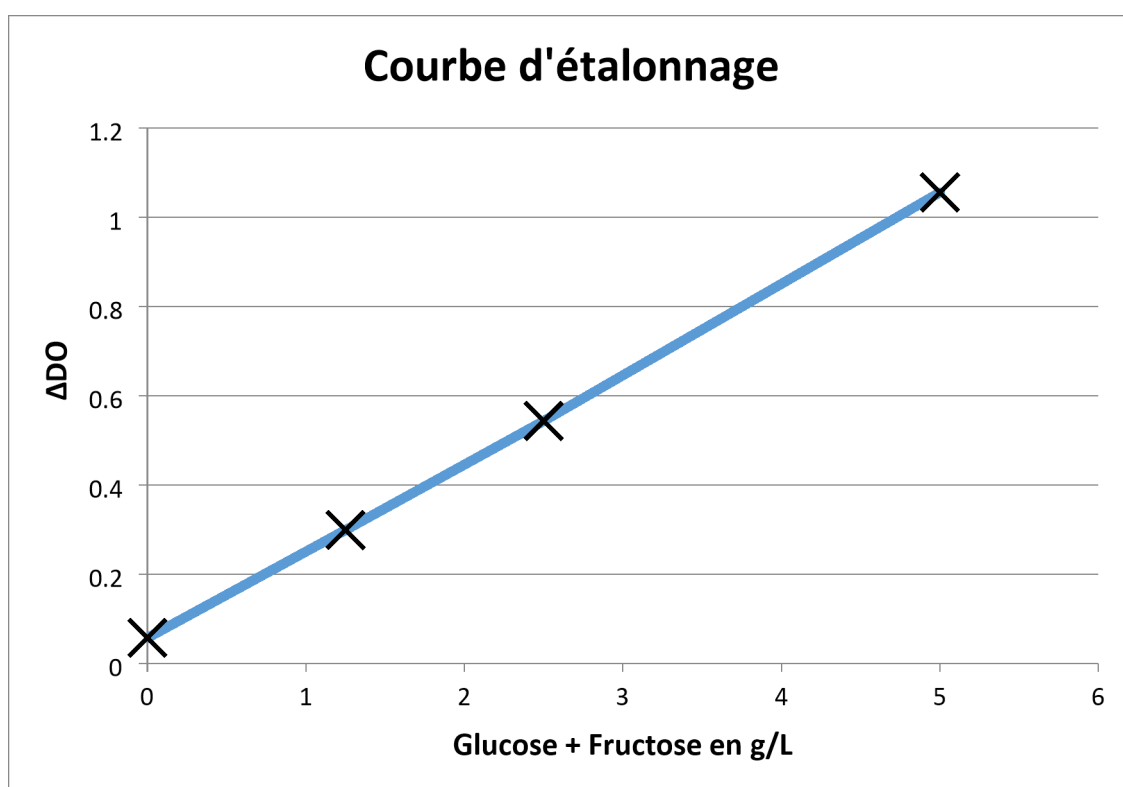


Figure 2 : Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage peut être d'ordre 1 ($Concentration = a.\Delta DO + b$) voire d'ordre 2 ($Concentration = a.\Delta DO^2 + b.\Delta DO + c$). Dans le cas d'utilisation d'une courbe

d'étalonnage d'ordre 2, le laboratoire devra veiller à limiter le domaine d'étalonnage afin de maintenir une sensibilité suffisante de la méthode (risque d'écrasement de la courbe).

La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats de D-glucose + D-fructose sont exprimés en g/L, avec deux décimales.

Précision

Reproductibilité interlaboratoire

$RSD_R = 5\%$ (à partir de 1,00 g/L)

$CV_R\% (k=2) = 2.RSD_R = 10\%$, (à partir de 1,00 g/L)

Répétabilité

$RSD_r = 1,5\%$ (à partir de 1,00 g/L)

$CV_r\% (k=2) = 2.RSD_r = 3\%$ (à partir de 1 g/L)

Limite de quantification

LQ validée = 0,10 g/L

(Concentration où $CV_R\% (k=2) = 60\%$)

ANNEXE

Résultats de l'étude interlaboratoire

Etude collaborative

17 Laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative, organisée en 2016.

Labo	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	ESPAGNE
Estación Enológica de Castilla y León	ESPAGNE

INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	ESPAGNE
Estación Enológica de Haro	ESPAGNE
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IP	Portugal
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	Portugal
Laboratoires Dubernet	France
Laboratoire Diœnos Rhône	France
Laboratoire Natoli	France
SCL Montpellier	France
Agricultural institute of Slovenia	SloveniE
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe	ALLEMAGNE
HBLAuBA Wein - und Obstbau	AUTRICHE
Landesuntersuchungsamt Mainz	ALLEMAGNE
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkforschung	ALLEMAGNE
Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologico - Fondazione Edmund Mach	ItaliE
Unione Italiana Vini soc. Coop.	ItaliE

2 x 10 échantillons en double aveugle ont été analysés, avec une répétition. Les vins analysés sont des vins originaires de France et du Portugal, vins secs et vins de liqueur.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

position		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Labo3	rep#1	94,00	96,00	3,40	3,50	0,40	0,40	0,90	1,10	2,10	2,50	0,10	0,10	1,40	1,40	5,60	5,90	4,70	4,20	17,50	17,00
	rep#2	96,00	98,00	3,50	3,60	0,40	0,30	1,00	1,10	2,20	2,40	0,10	0,10	1,40	1,40	5,70	6,00	4,30	4,50	17,50	17,00
Labo 6	rep#1	97,50	95,00	3,42	3,25	0,35	0,48	1,05	0,98	3,24	2,65	0,08	0,05	1,42	1,40	5,49	5,57	4,04	4,11	13,63	19,00
	rep#2	97,00	94,50	3,39	3,29	0,37	0,57	1,08	1,01	3,34	2,66	0,08	0,08	1,52	1,45	5,42	5,52	3,95	4,13	13,70	20,50
Labo7	rep#1	99,22	99,53	3,46	3,56	0,31	0,34	1,00	0,98	2,50	2,58	0,04	0,04	1,49	1,39	5,77	5,75	4,26	4,35	17,66	17,35
	rep#2	100,30	98,90	3,53	3,53	0,31	0,32	1,02	1,02	2,48	2,50	0,04	0,02	1,48	1,34	5,89	5,79	4,23	4,40	17,21	17,94
Labo9	rep#1	92,00	94,20	3,05	3,03	0,29	0,30	0,93	0,97	2,30	2,16	0,04	0,04	1,25	1,25	5,02	5,01	3,98	3,76	15,60	15,76
	rep#2	95,00	97,25	3,03	3,23	0,32	0,31	0,94	0,90	2,20	2,29	0,03	0,04	1,27	1,25	5,14	5,39	3,80	4,06	16,64	16,40
Labo 10	rep#1	90,79	92,31	3,27	3,36	0,34	0,34	0,97	1,01	2,28	2,30	0,09	0,07	1,28	1,26	5,46	5,42	3,27	3,36	17,92	17,99
	rep#2	92,13	91,65	3,34	3,24	0,32	0,35	0,97	1,04	2,28	2,33	0,08	0,08	1,32	1,28	5,18	5,37	3,34	3,24	17,58	17,68
Labo 11	rep#1	91,40	91,28	3,06	3,12	0,57	0,30	0,95	0,93	2,15	2,18	0,07	0,05	1,16	1,22	5,19	5,34	3,70	3,86	16,22	16,47
	rep#2	90,13	89,94	3,10	3,14	0,56	0,30	0,93	0,93	2,14	2,18	0,07	0,06	1,16	1,20	5,28	5,18	3,76	3,86	16,13	16,33
Labo12	rep#1	100,00	100,00	3,25	3,27	0,34	0,33	1,03	1,10	2,35	2,75	0,08	0,10	1,30	1,39	5,66	5,64	4,07	4,13	17,30	17,44
	rep#2	101,00	97,00	3,22	3,25	0,34	0,33	1,03	1,11	2,36	2,75	0,08	0,10	1,30	1,39	5,62	5,68	4,07	4,15	17,50	17,80
Labo13	rep#1	96,60	96,00	3,04	3,07	0,34	0,31	0,97	0,94	2,26	2,50	0,05	0,04	1,25	1,25	5,21	5,29	3,84	3,99	16,08	16,03
	rep#2	96,00	95,10	3,07	3,12	0,32	0,32	0,97	1,04	2,25	2,25	0,04	0,04	1,25	1,28	5,24	5,31	3,90	3,97	15,95	16,18
Labo 14	rep#1	104,00	98,00	3,19	3,16	0,33	0,33	0,97	0,96	2,47	2,44	0,05	0,05	1,34	1,32	5,77	5,81	4,20	4,21	17,76	17,04
	rep#2	103,00	96,00	3,18	3,17	0,33	0,33	0,97	0,97	2,48	2,44	0,05	0,05	1,34	1,32	5,77	5,78	4,20	4,14	17,44	17,24
Labo 15	rep#1	110,03	99,25	3,63	3,60	0,20	0,19	0,94	0,97	2,54	2,36			1,30	1,20	5,65	6,14	4,56	4,43	17,16	19,33
	rep#2	104,39	99,34	3,59	3,72	0,20	0,20	0,94	0,95	2,52	2,32			1,32	1,20	5,62	6,19	4,39	4,54	17,41	19,29
Labo16	rep#1	95,20	94,08	3,20	3,22	0,32	0,32	0,96	0,96	2,24	2,26	0,06	0,06	1,23	1,23	5,19	5,19	3,89	3,84	17,82	17,38
	rep#2	96,00	94,41	3,17	3,18	0,31	0,33	0,95	0,94	2,25	2,22	0,06	0,06	1,24	1,22	5,13	5,15	3,85	3,86	17,84	17,24
Labo17	rep#1	96,68	97,10	3,28	3,38	0,47	0,43	1,03	1,03	2,41	2,46	0,10	0,20	1,36	1,36	5,52	5,53	4,09	4,00	16,42	17,30
	rep#2	97,08	99,40	3,24	3,33	0,39	0,38	0,95	0,96	2,30	2,36	0,20	0,15	1,32	1,24	5,38	5,40	3,95	4,10	16,50	16,60
Labo18	rep#1	90,23	91,39	3,14	3,26	0,46	0,47	1,12	1,10	2,30	2,44	0,23	0,24	1,38	1,30	5,19	5,49	3,91	4,10	14,83	14,89
	rep#2	90,02	91,74	3,18	3,31	0,47	0,47	1,07	1,07	2,31	2,40	0,23	0,24	1,38	1,32	5,23	5,45	3,94	4,04	14,82	14,85
Labo19	rep#1	99,63	103,55	3,34	3,41	0,32	0,32	0,98	0,97	2,38	2,41	0,04	0,05	1,29	1,30	5,68	5,56	4,10	4,11	17,61	17,49
	rep#2	100,57	103,28	3,36	3,42	0,32	0,32	0,98	0,97	2,36	2,42	0,05	0,05	1,29	1,31	5,61	5,59	4,10	4,11	17,53	17,51
Labo20	rep#1	96,41	96,18	3,20	3,23	0,32	0,32	0,96	0,95	2,26	2,32	0,07	0,08	1,24	1,24	5,35	5,40	3,92	4,03	16,36	16,51
	rep#2	96,32	95,89	3,18	3,23	0,32	0,32	0,96	0,95	2,26	2,32	0,07	0,08	1,24	1,24	5,35	5,38	3,92	4,03	16,38	16,49
Labo21	rep#1	103,60	102,02	3,37	3,60	0,23	0,25	0,95	0,98	2,41	2,49	0,05	0,05	1,27	1,33	5,95	6,12	4,02	4,53	18,41	19,70
	rep#2	102,50	103,02	3,34	3,51	0,23	0,26	0,92	0,98	2,45	2,45	0,03	0,05	1,26	1,27	6,02	5,99	4,09	4,42	18,96	19,90
Labo22	rep#1	96,73	96,59	3,25	3,28	0,28	0,28	0,92	0,93	2,25	2,31	0,06	0,05	1,23	1,28	5,51	5,47	4,02	3,98	17,09	17,10
	rep#2	97,06	96,34	3,24	3,21	0,30	0,30	0,93	0,93	2,26	2,30	0,04	0,05	1,21	1,24	5,40	5,39	4,03	4,04	17,05	17,01

Tableau des données obtenues. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs rejetées conformément au test de Cochran (variance aberrante) au niveau de rejet 2,5% (test unilatéral) et de Grubbs (moyennes aberrantes) au niveau de rejet de 2,5 % (test bilatéral).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nb de laboratoires retenus	15	17	14	17	14	14	17	16	15	14
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	90,69	3,08	0,20	0,93	2,16	0,04	1,19	5,14	3,80	14,85
Maxi	102,79	3,64	0,47	1,09	2,52	0,10	1,45	6,02	4,48	17,79
Moyenne globale	96,31	3,29	0,32	0,98	2,34	0,06	1,30	5,50	4,05	16,86
Variance de répétabilité	1,449	0,004	0,000	0,001	0,004	0,000	0,001	0,009	0,005	0,065
Ecartype interlaboratoire	3,60	0,16	0,06	0,05	0,10	0,02	0,07	0,26	0,17	0,83
Variance de reproductibilité	14,037	0,029	0,004	0,003	0,013	0,000	0,006	0,073	0,034	0,739
Ecartype de répétabilité	1,20	0,06	0,01	0,04	0,06	0,01	0,04	0,09	0,07	0,26
Limite r	3,40	0,17	0,04	0,10	0,17	0,02	0,11	0,26	0,21	0,72
RSD _r répétabilité	1,2%	1,8%	4,4%	3,6%	2,5%	13,2%	2,9%	1,7%	1,8%	1,5%
Ecartype de reproductibilité	3,75	0,17	0,07	0,06	0,11	0,02	0,08	0,27	0,19	0,86
Limite R	10,60	0,48	0,19	0,16	0,32	0,06	0,22	0,76	0,52	2,43
RSD _R reproductibilité	3,9%	5,1%	20,4%	5,7%	4,8%	35,3%	6,1%	4,9%	4,6%	5,1%
Horwitz RSD _r	1,877	3,120	4,425	3,742	3,284	5,694	3,588	2,889	3,025	2,440
Horrat r	0,666	0,587	1,001	0,952	0,773	2,315	0,804	0,585	0,593	0,621
Horwitz RSD _R	2,84	4,73	6,70	5,67	4,98	8,63	5,44	4,38	4,58	3,70

Horrat R	1,368	1,086	3,036	0,997	0,965	4,087	1,123	1,122	1,000	1,378
----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tableau des résultats obtenus

Note : Les résultats de l'échantillon F sont à prendre avec réserve, en raison du niveau très faible de concentration, en dessous de la limite de quantification des laboratoires.

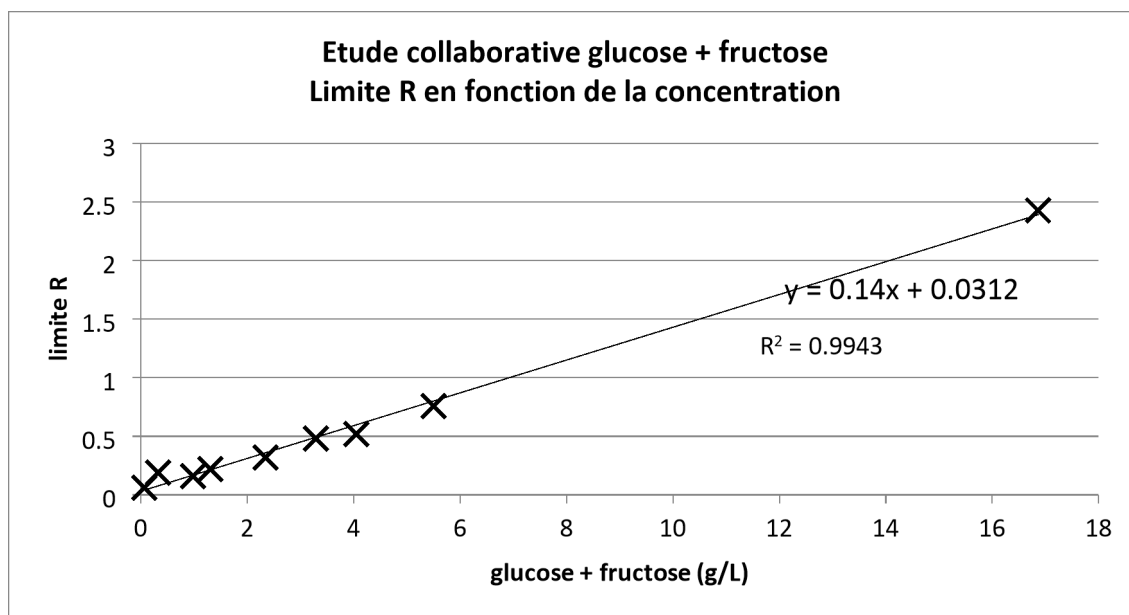


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

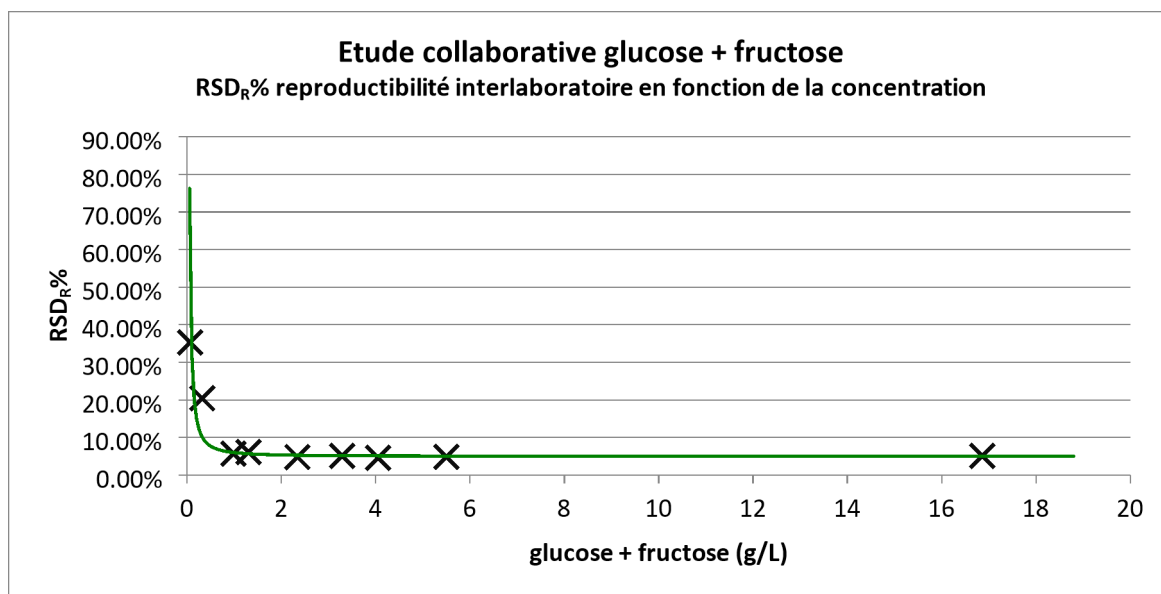


Figure 4 : RSD_R % interlaboratoire en fonction de la concentration.

Modélisation : $RSD_R\% = 1,000.C^{(-1,424)} + 5$