



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025849

(51)⁷ A01N 35/04; A01N 37/36; A01N 37/38; (13) B
A01N 37/46; A01N 37/50; A01N 43/30;
A01N 43/36; A01N 43/40; A01N 43/50;
A01N 43/54; A01N 43/56; A01N
43/653; A01N 43/84; A01N 43/88;
A01N 47/02; A01N 47/12; A01N 47/18;
A01N 37/34

(21) 1-2014-04375

(22) 13/06/2013

(86) PCT/EP2013/062306 13/06/2013

(87) WO/2013/186325 A1 19/12/2013

(30) MI2012A 001045 15/06/2012 IT

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/08/2015 329A

(73) STICHTING I-F PRODUCT COLLABORATION (NL)

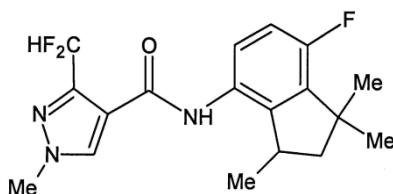
Prins Bernhardplein 200 NL-1097 JB Amsterdam Netherlands

(72) PELLACINI, Franco (IT); RISERVATO, Manuela (IT); SINANI, Entela (IT);
GUSMEROLI, Marilena (IT); VAZZOLA, Matteo Santino (IT).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM HIỆP ĐỒNG DÙNG ĐỂ BẢO VỆ CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP VÀ
PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT SỬ DỤNG CHẾ
PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm hiệp đồng bao gồm:
một thành phần (A), bao gồm hợp chất có công thức (I) 3-diflometyl-N-(7-flo-1,1,3-
trimetyl-4-indanyl)-1-metyl-4-pyrazolcarboxamit



(I),

một hoặc nhiều thành phần (B) có hoạt tính diệt nấm hoặc diệt côn trùng, và chế phẩm theo
sáng chế được dùng để phòng trừ các côn trùng gây hại ở cây trồng nông nghiệp. Ngoài ra,
sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật và phương pháp
phòng trừ các côn trùng gây hại ở cây trồng nông nghiệp mà sử dụng chế phẩm đã nêu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm hiệp đồng dùng để bảo vệ cây trồng nông nghiệp, và phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp mà sử dụng chế phẩm này. Cụ thể là, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hợp chất thuộc lớp chất N-indanyl-pyrazolcarboxamit và một hoặc nhiều hợp chất diệt nấm hoặc diệt côn trùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi ứng dụng các sản phẩm chống ký sinh vào nông nghiệp, ứng dụng đã được biết đến rộng rãi là kết hợp hai hoặc nhiều sản phẩm có cơ chế hoạt động khác nhau và/hoặc mục đích sinh học khác nhau để mở rộng phạm vi hoạt động của các hỗn hợp so với các sản phẩm được sử dụng riêng rẽ và tránh xảy ra hiện tượng kháng thuốc của các sinh vật gây hại, hiện tượng mà có xu hướng làm giảm hiệu quả của các sản phẩm chống ký sinh được sử dụng qua thời gian.

Các chế phẩm diệt nấm N-indanyl-1-metyl-3-(halo)alkyl-4-pyrazolcarboxamit với các hợp chất diệt nấm hoặc diệt côn trùng như các azol, strobilurin, axylalanin, phenylpyrol, clothalonil, dithio-carbamat, abamectin, diamit diệt côn trùng, neonicotinoit, sulfoxaflo, pyrethroit, carbamat, phenylpyrazol, đã được mô tả trong các đơn đăng ký sáng chế quốc tế có công bố WO 2011/135833, WO 2011/135835, WO 2011/135836, WO 2011/135837, WO 2011/135838, WO 2011/135839, WO 2011/135827, WO 2011/135828, WO 2011/135830, WO 2011/135831, WO 2011/135832, WO 2011/135834, WO 2011/135840.

Chủ đơn đã bất ngờ phát hiện ra rằng khi kết hợp một hợp chất diệt nấm đặc hiệu thuộc lớp N-indanyl-pyrazolcarboxamit với một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ hàng loạt các hợp chất có hoạt tính diệt nấm hoặc diệt côn trùng, các chế phẩm thu được có các hoạt tính sinh học như sau:

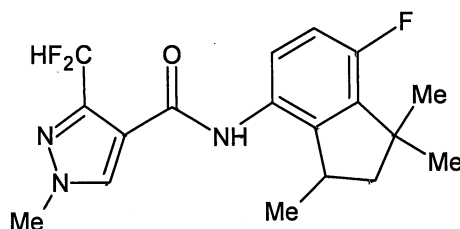
1) được cải thiện so với các hoạt tính kỳ vọng trên cơ sở các hoạt tính của sản phẩm được sử dụng riêng rẽ;

2) tốt hơn so với các hoạt tính có thể đạt được với các chế phẩm được bộc lộ trong các tài liệu sáng chế nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích thứ nhất của sáng chế là đề xuất chế phẩm hiệp đồng dùng để bảo vệ cây trồng nông nghiệp bao gồm:

- ít nhất một thành phần [A] bao gồm hợp chất có công thức (I) 3-diflometyl-N-(7-fluoro-1,1,3-trimethyl-4-indanyl)-1-methyl-4-pyrazolcarboxamit



(I)

trong đó, Me là nhóm methyl (CH_3 -),

- ít nhất một thành phần [B] được chọn từ các hợp chất diệt nấm hoặc diệt côn trùng thuộc một hoặc nhiều nhóm hợp chất diệt nấm và diệt côn trùng sau:

các hợp chất diệt nấm:

i) các azol;

ii) các dẫn xuất amin;

iii) các strobilurin;

iv) các hợp chất chống nấm phần trắng đặc hiệu;

v) các anilin-pyrimidin;

vi) các benzimidazol và chất đồng đẳng;

vii) các dicarboximit;

viii) các thuốc diệt nấm được polyhalogen hóa;

ix) các chất cảm ứng của hệ thống kháng tập nhiễm (systemic acquired resistance-SAR);

x) các phenylpyrol;

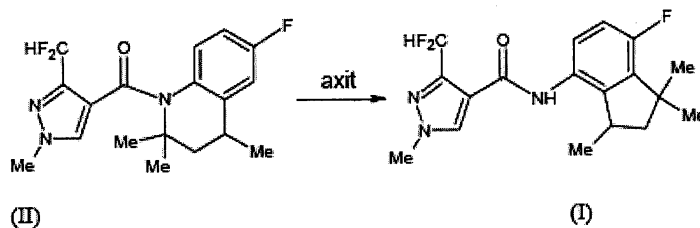
- xi) các axylalanin;
- xii) các hợp chất chống bệnh đốm phân trắng;
- xiii) các dithiocarbamat;
- xiv) các arylamidin;
- xv) axit phosphoric và các dẫn xuất của nó;
- xvi) các hợp chất diệt nấm chứa đồng;
- xvii) các amit diệt nấm;
- xviii) các dị vòng nitơ;
- các hợp chất diệt côn trùng:
- xix) các neonicotinoit;
- xx) các phenylpyrazol;
- xxi) các pyrethroit;
- xxii) các carbamat;
- xxiii) các macrolit có nguồn gốc vi sinh;
- xxiv) các diamit diệt côn trùng;
- xxv) các dẫn xuất triflometylpyridyl.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế:

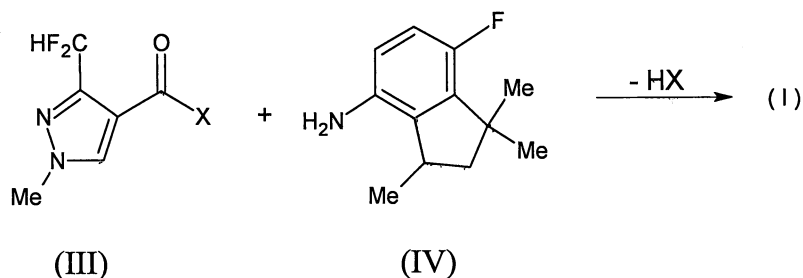
1) bằng cách đồng phân axit hóa hợp chất N-(3-diflometyl-1-metyl-1H-4-pyrazolcarbonyl)-6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin (II), theo sơ đồ phản ứng 1, và như được mô tả trong ví dụ 1:

Sơ đồ 1



2) bằng cách ngưng tụ axit 3-diflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxylic hoặc dẫn xuất của nó, có công thức chung (III), với 7-flo-1,1,3-trimetyl-4-aminoindan (IV), bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực hóa học hữu cơ, theo sơ đồ 2:

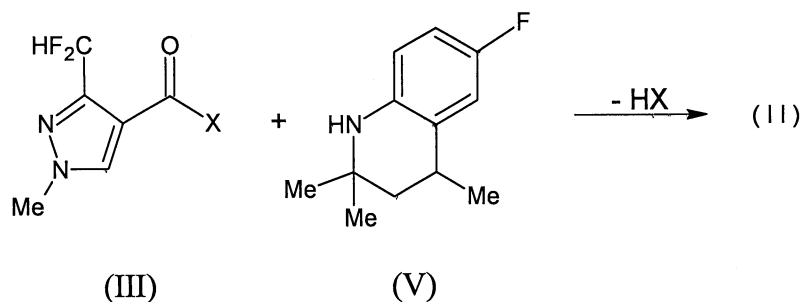
Sơ đồ 2



trong đó, X là nhóm được chọn từ OH, C₁-C₆ alkoxy hoặc nguyên tử halogen (tốt hơn là clo).

Hợp chất trung gian có công thức (II) lần lượt thu được bằng cách ngưng tụ hợp chất có công thức chung (III) với 6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin (V), theo sơ đồ 3:

Sơ đồ 3



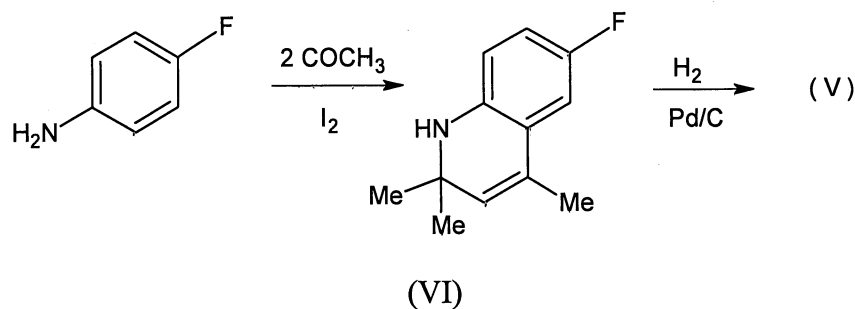
trong đó, X là nhóm được chọn từ OH, C₁-C₆ alkoxy hoặc nguyên tử halogen (tốt hơn là clo).

Axit 3-diflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxylic và các dẫn xuất của nó có công thức chung (III) là các sản phẩm đã được biết, được mô tả, ví dụ, trong patent Hoa Kỳ số US 5093347.

Hợp chất trung gian có công thức (V) có thể được điều chế, theo sơ đồ phản ứng 4, bằng cách hydro hóa 6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2-dihydroquinolin (VI), lần lượt thu được theo phương pháp được mô tả trong Organic Synthesis, Coll. Vol. III, trang 329,

bắt đầu từ axeton và 4-floanilin:

sơ đồ 4



trong các công thức từ (I) đến (VI) nêu trên, Me là là nhóm metyl (CH_3 -).

Aminoindan có công thức (IV) có thể được điều chế, tương tự như hợp chất được mô tả trong patent số EP 0654464, bằng cách ngưng tụ 6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2-dihydroquinolin (VI) với axit carboxylic hoặc dẫn xuất của nó, hydro hóa trên Pd/C, isome hóa bằng axit sulfuric và thủy phân liên kết amit bằng nước trong axit axetic.

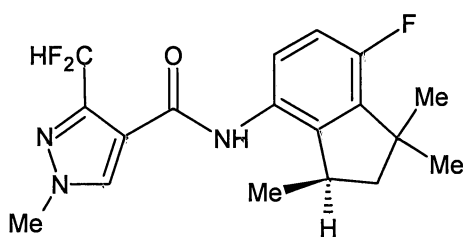
Hợp chất có công thức (I) chứa nguyên tử cacbon bất đối ở vị trí 3 của nhóm indanyl và thường thu được dưới dạng hỗn hợp raxemic của hai chất đồng phân đối ảnh có cấu hình R và S (tỷ lệ mol R:S bằng 1:1). Tuy nhiên, có thể điều chế hỗn hợp của hai chất đồng phân đối ảnh của hợp chất có công thức (I), trong đó tỷ lệ R:S khác với 1:1 (các hỗn hợp được làm giàu).

Hơn nữa, có thể điều chế chất đồng phân đối ảnh R và S riêng lẻ của hợp chất có công thức (I) ở dạng gần như tinh khiết (> 99,99% trọng lượng).

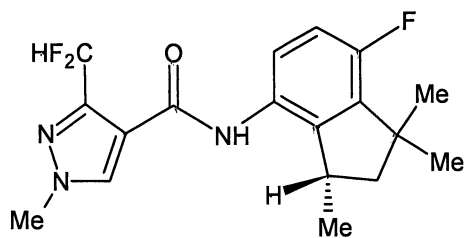
Hỗn hợp được làm giàu đồng phân đối ảnh nêu trên và các chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ gần gần như tinh khiết có thể được điều chế, ví dụ, bằng cách ngưng tụ các hợp chất có công thức chung (III) với các dạng được làm giàu hoặc tinh khiết quang học (chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ gần như tinh khiết) của aminoindan có công thức (IV), theo sơ đồ phản ứng 2; dạng được làm giàu hoặc dạng tinh khiết quang học của aminoindan có công thức (IV) có thể lần lượt thu được qua các phản ứng chọn lọc quang học và/hoặc phép tách hóa học và/hoặc sắc ký đối với các chất đồng phân đối ảnh, theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu về các sản phẩm đồng đẳng, ví dụ, như được mô tả trong patent EP 0654464 nêu trên.

Trong chế phẩm hiệp đồng theo sáng chế, hợp chất có công thức (I) có thể là

hỗn hợp racemic, (I)-RS, hoặc hỗn hợp được làm giàu của một trong hai chất đồng phân đối ảnh, hoặc thậm chí là chất đồng phân đối ảnh gần như tinh khiết đặc hiệu (I)-R hoặc (I)-S.



(I)-R



(I)-S

Trong trường hợp các hỗn hợp được làm giàu của hợp chất có công thức (I), các hỗn hợp được làm giàu trong chất đồng phân đối ảnh R được ưu tiên, tốt hơn là, theo tỷ lệ R:S của hai chất đồng phân đối ảnh nằm trong khoảng từ 51:49 đến 99,99:0,01 trọng lượng.

Trong hai dạng đồng phân đối ảnh của hợp chất có công thức (I), isome gần như tinh khiết R được ưu tiên.

Các hợp chất dùng để chọn thành phần [B] của chế phẩm hiệp đồng được chỉ ra ở đây với tên ISO quốc tế chung của chúng; các cấu trúc hóa học và tên hóa học CAS và IUPAC của chúng được thông báo trên website của Alan Wood (www.alanwood.net), Compendium of Pesticide Common Names; đối với hầu hết các hợp chất, các dấu hiệu này cũng được thông báo, cùng với dữ liệu lý-hóa và dấu hiệu sinh học, trong “Pesticide Manual”, C.D.S. Tomlin, 15th Edition, 2009, British Crop Production Council Editor.

Các ví dụ về các arylamidin diệt nấm ở nhóm xiv được báo cáo trong các đơn đăng ký sáng chế quốc tế có công bố WO 2000/46184, WO 2007/031508, WO 2009/156098.

Các thành phần [B] được ưu tiên của chế phẩm theo sáng chế là:

i) các azol: azaconazol, bitertanol, bromuconazol, xyproconazol, difenoconazol, epoxyconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imazalil, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, proclora, prothioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetra-conazol, triadimefon, triadimenol, triflumizol, triticonazol;

- ii) các dẫn xuất amin: aldimorph, dodin, dodemorph, fen-propimorph, fenpropidin, guazatin, iminoctadin, spiroxamin, tridemorph;
- iii) các strobilurin: azoxystrobin, dimoxystrobin, fluoxa-strobin, kresoxim-metyl, metominostrobin, orysastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, pyrameto-strobin, pyraoxostrobin, trifloxystrobin;
- iv) các hợp chất chống nấm phân trắng đặc hiệu: xyflufenamit, flutianil, metrafenon, proquinazit, pyriofenon, quinoxifen;
- v) anilin-pyrimidin: pyrimetanil, mepanipyrim, xyprodinil;
- vi) các benzimidazol và chất đồng đẳng: benomyl, carbendazim, fuberidazol, thiabendazol, thiophanat-metyl;
- vii) các dicarboximit: iprodion, proxymidon;
- viii) các thuốc diệt nấm được polyhalogen hóa: clothalonil, captan, captafol, folpet, diclofluanit, tolylfluanit;
- ix) các chất cảm ứng của SAR: axibenzola, probenazol, isotianil, tiadinil;
- x) các phenylpyrol: fenpiclonil, fludioxonil;
- xi) các axylalanin: benalaxyl, benalaxyl-M, furalaxyl, metalaxyl, metalaxyl-M;
- xii) các hợp chất chống bệnh đốm phân trắng: ametoctradin, amisulbrom, benthiavalicarb, xyazofamit, xymoxanil, dimetomorph, etaboxam, famoxadon, fenamidon, flumetover, flumorph, fluopicolit, iprovalicarb, mandipropamit, valifenalat;
- xiii) các dithiocarbamat: maneb, mancozeb, propineb, zineb;
- xiv) các arylamidin: N-etyl-N-metyl-N'-{4-[3-(4-clobenzyl)-1,2,4-thiadiazolyl-5-oxy]-2,5-xylyl}-formamidin;
- xv) axit phosphoric và các dẫn xuất: fosetyl-nhôm, kali phosphit, natri phosphit, colin phosphit;
- xvi) các thuốc diệt nấm chứa đồng: đồng (II) hydroxit, đồng oxyclorea, đồng (II) sulfat, hỗn hợp Bordeaux, đồng salyxilat $C_7H_4O_3 \cdot Cu$, đồng oxit Cu_2O ;
- xvii) các amit diệt nấm: carpropamit, fenhexamit, silthiofam, zoxamit, bixafen,

boscalit, carboxin, fluopicolit, fluopyram, flutolanil, fluxapyroxat, furametpy, isopyrazam, oxycarboxin, penflufen, pen thiopyrat, sedaxan, thifluzamit;

xviii) các dị vòng nito: fenpyrazamin, fluazinam, pyribencarb, tebufloquin;

xix) các neonicotinoit: axetamiprit, clothianidin, dinotefuran, flupyradifuron, imidacloprit, nitenpyram, thiacloprit, thiametoxam;

xx) các phenylpyrazol: ethiprol, fipronil, flufiprol, pyrafluprol, pyriprol;

xxi) các pyrethroit: bifenthrin, beta-xyfluthrin, xyhalothrin lamda, xypermethrin, deltamethrin, tefluthrin;

xxii) các carbamat: oxamyl, thiodicarb, carbosulfan, methiocarb, carbofuran;

xxiii) các macrolit có nguồn gốc vi sinh vật: abamectin, emamectin benzoat, spinetoram, spinosat;

xxiv) các diamit diệt côn trùng: clorantraniliprol, xyantraniliprol, flubendiamit;

xxv) các dẫn xuất triflometylpyridyl: flonicamit, sulfoxaflo.

Trong số các hợp chất nêu trên, các thành phần[B] được ưu tiên cụ thể là:

i) xyproconazol, difenoconazol, epoxyconazol, flutriafol, penconazol, proclora, prothioconazol, tebuconazol, tetraconazol;

ii) fenpropimorph, spiroxamin;

iii) azoxystrobin, fluoxastrobin, kresoxim-metyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin;

iv) metrafenon, proquinazit;

v) mepanipyrim, xyprodinil;

vi) iprodion, proxymidon;

vii) carbendazim, thiophanat-metyl;

viii) clothalonil;

x) fludioxonil;

xi) benalaxyl, benalaxyl-M, metalaxyl-M;

xii) benthiavalicarb, xyazofamit, xymoxanil, dimetomorph, mandipropamit,

valifenalat;

xvi) đồng (II) hydroxit, đồng oxyclorea, đồng (II) sulfat, đồng salyxilat $C_7H_4O_3 \cdot Cu$, đồng oxit Cu_2O ;

xix) clothianidin, imidacloprit, thiacloprit, thiametoxam;

xx) ethiprol, fipronil;

xxi) xylothrin lamda, deltamethrin, tefluthrin;

xxiv) cloranthraniliprol, flubendiamit.

Các tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] và [B] trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi trong phạm vi rộng, thậm chí phụ thuộc vào các vị trí para cần được kiểm soát và phụ thuộc vào thành phần [B] duy nhất được sử dụng (hoặc nhiều thành phần [B] được sử dụng), và thường nằm trong khoảng từ 1:20 đến 20:1.

Các chế phẩm được ưu tiên là các chế phẩm bao gồm ít nhất các tổ hợp của các hợp chất sau:

C1: (I)-RS + tetraconazol;

C2: (I)-RS + tebuconazol;

C3: (I)-RS + xyproconazol;

C4: (I)-RS + difenoconazol;

C5: (I)-RS + epoxyconazol;

C6: (I)-RS + flutriafol;

C7: (I)-RS + penconazol;

C8: (I)-RS + prothioconazol;

C9: (I)-RS + proclora;

C10: (I)-RS + fenpropimorph;

C11: (I)-RS + spiroxamin;

C12: (I)-RS + azoxystrobin;

C13: (I)-RS + fluoxastrobin;

C14: (I)-RS + kresoxim-metyl;

- C15: (I)-RS + picoxystrobin;
C16: (I)-RS + pyraclostrobin;
C17: (I)-RS + trifloxystrobin;
C18: (I)-RS + metrafenon;
C19: (I)-RS + proquinazitol;
C20: (I)-RS + mepanipyrim;
C21: (I)-RS + xyprodinil;
C22: (I)-RS + iprodion;
C23: (I)-RS + proxymidon;
C24: (I)-RS + carbendazim;
C25: (I)-RS + thiophanat-metyl;
C26: (I)-RS + clothalonil;
C27: (I)-RS + fludioxonil;
C28: (I)-RS + benalaxyl-M;
C29: (I)-RS + metalaxyl-M;
C30: (I)-RS + benthiavalicarb;
C31: (I)-RS + xyazofamit;
C32: (I)-RS + xymoxanil;
C33: (I)-RS + dimetomorph;
C34: (I)-RS + mandipropamit;
C35: (I)-RS + valifenalat;
C36: (I)-RS + đồng salyxilat $C_7H_4O_3 \cdot Cu$;
C37: (I)-RS + đồng oxit Cu_2O ;
C38: (I)-RS + clothianidin;
C39: (I)-RS + imidaclopritol;
C40: (I)-RS + thiaclopritol;

- C41: (I)-RS + thiametoxam;
- C42: (I)-RS + ethiprol;
- C43: (I)-RS + fipronil;
- C44: (I)-RS + xyhalothrin lamda;
- C45: (I)-RS + deltamethrin;
- C46: (I)-RS + tefluthrin;
- C47: (I)-RS + clorantraniliprol;
- C48: (I)-RS + flubendiamit;
- C49: (I)-RS + tetraconazol + azoxystrobin;
- C50: (I)-RS + tebuconazol + azoxystrobin;
- C51: (I)-RS + epoxyconazol + azoxystrobin;
- C52: (I)-RS + xyproconazol + azoxystrobin;
- C53: (I)-RS + propiconazol + azoxystrobin;
- C54: (I)-RS + prothioconazol + azoxystrobin;
- C55: (I)-RS + tetraconazol + picoxystrobin;
- C56: (I)-RS + tebuconazol + picoxystrobin;
- C57: (I)-RS + epoxyconazol + picoxystrobin;
- C58: (I)-RS + xyproconazol + picoxystrobin;
- C59: (I)-RS + propiconazol + picoxystrobin;
- C60: (I)-RS + prothioconazol + picoxystrobin;
- C61: (I)-RS + tetraconazol + kresoxim metyl;
- C62: (I)-RS + tebuconazol + kresoxim metyl;
- C63: (I)-RS + epoxyconazol + kresoxim metyl;
- C64: (I)-RS + xyproconazol + kresoxim metyl;
- C65: (I)-RS + propiconazol + kresoxim metyl;
- C66: (I)-RS + prothioconazol + kresoxim metyl;

C67: (I)-RS + clothalonil + azoxystrobin;

C68: (I)-RS + clothalonil + picoxystrobin;

C69: (I)-RS + clothalonil + pyraclostrobin;

C70: (I)-RS + clothalonil + kresoxim metyl;

C71: (I)-RS + đồng (II) hydroxit + đồng oxy-clorua;

C72: (I)-RS + đồng (II) hydroxit + đồng oxy-clorua + đồng salyxilat $C_7H_4O_3 \cdot Cu$;

C73: (I)-R₈S₂ + tetraconazol;

C74: (I)-R₈S₂ + azoxystrobin;

C75: (I)-R₈S₂ + benalaxyl;

C76: (I)-R₉S₁ + tetraconazol;

C77: (I)-R₉S₁ + azoxystrobin;

C78: (I)-R + tetraconazol;

trong đó:

- (I)-RS là hợp chất có công thức (I) ở dạng hỗn hợp raxemic,
- (I)-R₈S₂ là hợp chất có các chất đồng phân đối ảnh R và S theo tỷ lệ mol R:S = 8:2,
- (I)-R₉S₁ là hợp chất có các chất đồng phân đối ảnh R và S theo tỷ lệ mol R:S = 9:1,
- (I)-R là chất đồng phân đối ảnh R ở dạng gần như tinh khiết (>99,99% trọng lượng).

Tốt hơn là, trong các chế phẩm C1-C25, C27-C35, C-38-C48 và C73-C77, tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] và [B] nằm trong khoảng từ 1:20 đến 20:1.

Tốt hơn là, trong các chế phẩm C26, C36, C37, tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] và [B] nằm trong khoảng từ 1:20 đến 20:10.

Tốt hơn là, trong các chế phẩm C49-C69, tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] với hai thành phần [B] ([A]:[B₁]:[B₂]) nằm trong khoảng từ 1:20:20 đến 20:1:1.

Tốt hơn là, trong chế phẩm C70, tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] với hai thành phần [B] ([A]:[B₁]:[B₂]) nằm trong khoảng từ 1:20:20 đến 20:10:1, trong khi đó, trong chế phẩm C71, tỷ lệ [A]:[B₁]:[B₂] nằm trong khoảng từ 1:20:20 đến 20:10:10.

Tốt hơn là, trong chế phẩm C72, tỷ lệ trọng lượng của thành phần [A] với ba

thành phần [B] ([A]:[B₁]:[B₂]:[B₃]) nằm trong khoảng từ 1:20: 20:20 đến 20:10:10:10.

Như nêu trên, các chế phẩm theo sáng chế thể hiện tác dụng hiệp đồng mạnh, mà có thể được đánh giá bằng cách áp dụng công thức Colby (“Weeds”, 1967, 15, trang 20-22):

$$E_t = E_A + E_B - (E_A \cdot E_B / 100)$$

trong đó E_t là phần trăm hiệu quả kỳ vọng đối với chế phẩm chứa các hợp chất A và B ở liều $d_A + d_B$, E_A là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần A ở liều d_A , E_B là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần B ở liều d_B .

Khi hiệu quả quan sát được đối với chế phẩm A+B (E_{A+B}) cao hơn so với hiệu quả kỳ vọng theo công thức Colby ($E_{A+B}/E_t > 1$), tức là có tác dụng hiệp đồng.

Trong trường hợp các tổ hợp có ba thành phần, công thức Colby trở thành:

$$E_t = E_A + E_{B1} + E_{B2} - (E_A \cdot E_{B1} + E_A \cdot E_{B2} + E_{B1} \cdot E_{B2} / 100) + (E_A \cdot E_{B1} \cdot E_{B2} / 10000)$$

trong đó E_t là phần trăm hiệu quả kỳ vọng đối với chế phẩm chứa hợp chất A, B₁ và B₂ ở liều $d_A + d_{B1} + d_{B2}$, E_A là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần A ở liều d_A , E_{B1} là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần B₁ ở liều d_{B1} , E_{B2} là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần B₂ ở liều d_{B2} . Khi hiệu quả quan sát được đối với chế phẩm A+B₁+B₂ ($E_{A+B1+B2}$) cao hơn so với hiệu quả kỳ vọng theo công thức Colby ($E_{A+B1+B2}/E_t > 1$), tức là có tác dụng hiệp đồng.

Do tác dụng hiệp đồng cao, độ lớn của phạm vi hoạt động, sự giảm đáng kể về hiện tượng kháng vi sinh vật đích, các chế phẩm theo sáng chế được cung cấp với hoạt tính diệt nấm rất cao, mà có tác dụng đối với nhiều nấm gây bệnh thực vật tấn công cây trồng nông nghiệp quan trọng.

Các chế phẩm này gây ra hoạt tính diệt nấm mà có thể cứu chữa, ngăn ngừa hoặc loại bỏ, và thường có độc tính thực vật thấp hoặc không có độc tính thực vật trên các cây trồng được xử lý.

Do đó, các chế phẩm diệt nấm hiệp đồng theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp.

Các ví dụ về nấm gây bệnh thực vật mà có thể được xử lý hiệu quả và được diệt trừ bằng chế phẩm theo sáng chế, là các loại nấm thuộc nhóm nấm đảm, nấm nang,

nấm bắt toàn, nấm nước: *Puccinia* spp., *Ustilago* spp., *Tilletia* spp., *Uromyces* spp., *Phakopsora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp., *Podosphaera* spp., *Uncinula* spp., *Helminthosporium* spp., *Rhynchosporium* spp., *Pyrenophora* spp., *Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp., *Septoria* spp. (*Mycosphaerella* spp.), *Venturia* spp., *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp., *Cercospora herpotrichoides*, *Colletotrichum* spp., *Pyricularia oryzae*, *Sclerotium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Plasmopara viticola*, *Peronospora* spp., *Pseudoperonospora cubensis*, *Bremia lactucae*.

Các cây trồng chủ yếu có thể được bảo vệ bằng chế phẩm theo sáng chế bao gồm các ngũ cốc (lúa mỳ, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, lúa gạo, ngô, lúa miến, v.v.), cây ăn quả (táo, lê, mận, đào, hạnh nhân, anh đào, chuối, nho, dâu, mâm xôi, v.v.), các cây họ cam (cam, chanh, quýt, bưởi, v.v.), các cây họ đậu (đậu đỏ, đậu hà lan, đậu lăng, đậu tương, v.v.), rau (rau bina, rau diếp, măng tây, bắp cải, cà rốt, hành củ, cà chua, khoai tây, cà tím, ớt, v.v.), cây họ bầu (bí ngô, bí ngòi, dưa chuột, dưa, dưa hấu, v.v.), cây chứa dầu (hướng dương, cải dầu, đậu phộng, thầu dầu, dừa, v.v.), cây thuốc lá, cây cà phê, cây trà, cây ca cao, củ cải đường, cây mía, cây bông.

Cụ thể là, chế phẩm theo sáng chế được chứng minh là hữu dụng một cách cụ thể trong việc phòng trừ *Plasmopara viticola* trên các cây dây leo, *Phytophthora infestans* và *Botrytis Cinerea* trên cà chua, *Puccinia recondita*, *Erysiphe graminis*, *Helminthosporium teres*, *Septoria nodorum* và *Fusarium* spp. trên ngũ cốc, trong việc phòng trừ *Phakopsora pachyrhizi* trên đậu tương, trong việc phòng trừ *Uromyces Appendiculatus* trên đậu đỏ, trong việc phòng trừ *Venturia inaequalis* trên cây táo, trong việc phòng trừ *Sphaerotheca fuliginea* trên cây dưa chuột.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế cũng hữu dụng trong việc phòng trừ vi khuẩn và vi rút gây bệnh thực vật, như, ví dụ, *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Erwinia amylovora*, virus thể khảm ở thuốc lá.

Chế phẩm bao gồm ít nhất một hợp chất có công thức (I) và, là thành phần [B], ít nhất một hợp chất diệt côn trùng được chọn từ một hoặc nhiều nhóm hợp chất từ xix đến xxv nêu trên, ngoài việc có hoạt tính diệt nấm ưu việt, còn có hoạt tính diệt côn trùng ưu việt chống lại nhiều loài côn trùng gây hại cho cây trồng nông nghiệp.

Do đó, các chế phẩm theo sáng chế, bao gồm ít nhất một hợp chất có công thức (I) và ít nhất một hợp chất diệt côn trùng được chọn từ một hoặc nhiều nhóm hợp chất từ xix đến xxv nêu trên, có thể được sử dụng để phòng trừ các côn trùng gây hại ở cây trồng nông nghiệp.

Các ví dụ về côn trùng mà có thể được phòng trừ bằng chế phẩm nêu trên, là côn trùng thuộc thứ tự là bộ cánh nửa, bộ cánh vẩy, bộ cánh viền, bộ hai cánh, bộ cánh cứng, bộ cánh thẳng, bộ cánh màng: *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Brevicoryne brassicae*, *Toxoptera citricidus*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Aonidiella aurantii*, *Comstockaspis perniciosus*, *Unaspis citri*, *Psylla piri*, *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens*, *Nephotettix cincticeps*, *Nephotettix virescens*, *Chilo suppressalis*, *Ostrinia* spp., *Spodoptera* spp., *Mamestra brassicae*, *Agrotis* spp., *Thricoplusia* spp., *Heliothis* spp., *Helicoverpa* spp., *Pieris* spp., *Adoxophyes* spp., *Grapholita molesta*, *Cydia* spp., *Phyllonorycter blancardella*, *Lymantria* spp., *Plutella xylostella*, *Pectinophora gossypiella*, *Hyphantria cunea*, *Thrips* spp., *Frankliniella* spp., *Dacus* spp., *Ceratitis capitata*, *Liriomyza trifolii*, *Anthonomus grandis*, *Callosobruchus chinensis*, *Diabrotica* spp., *Agriotes* spp., *Tribolium* spp., *Locusta migratoria*, *Oxya* spp., *Solenopsis* spp., *Blattella germanica*, *Periplaneta* spp.

Ngay cả khi thành phần [A] và [B] có thể được trộn và áp dụng lên cây trồng cần được bảo vệ, đối với việc sử dụng thực tiễn trong nông nghiệp, thường tốt hơn là sử dụng các chế phẩm diệt nấm, theo sáng chế, ở dạng công thức phối chế kiểm dịch thực vật thích hợp.

Thành phần [A] và các thành phần [B] có thể được phối chế riêng rẽ và được trộn trong chất pha loãng đã được chọn trước (ví dụ, nước) tại thời điểm xử lý cây trồng nông nghiệp cần được bảo vệ, hoặc kết hợp với chế phẩm duy nhất sử dụng ngay trước khi xử lý.

Ở cả trong trường hợp các thành phần được phối chế riêng rẽ, và trong trường hợp thành phần [A] và [B] được kết hợp với nhau trong chế phẩm sử dụng ngay, chế phẩm này có thể ở dạng bột khô, bột ướt, phần cô đặc có thể nhũ tương hóa, nhũ tương, vi nhũ tương, hồ, hạt, hạt phân tán được trong nước, dung dịch, huyền phù, v.v.: việc chọn dạng chế phẩm phụ thuộc vào các đặc tính của thành phần A và B, và

vào việc sử dụng cụ thể.

Chế phẩm được điều chế bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, bằng cách pha loãng các thành phần hoạt tính với chất pha loãng dạng rắn hoặc dạng lỏng, có thể có chất hoạt động bề mặt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất ổn định, chất hỗ trợ, v.v..

Các hợp chất sau có thể được sử dụng, ví dụ, làm chất pha loãng dạng rắn hoặc chất mang: silica, cao lanh, bentonit, đá talc, đất diatomit, dolomit, canxi carbonat, magie carbonat, thạch cao, đất sét, silicat tổng hợp, attapulgit, sepiolit.

Các hợp chất sau có thể được sử dụng, ví dụ, làm dung môi hoặc chất pha loãng dạng lỏng, ngoài nước, dung môi hữu cơ thơm (hỗn hợp xylol hoặc alkylbenzol, clobenzen, v.v.), parafin (kiềm dầu), rượu (metanol, propanol, butanol, octanol, glyxerol, v.v.), este (etyl axetat, isobutyl axetat, alkyl carbonat, alkyl este của axit adipic, alkyl este của axit glutaric, alkyl este của axit succinic, alkyl este của axit lactic, v.v.), dầu thực vật (dầu hạt nho, dầu hướng dương, dầu đậu nành, dầu thầu dầu, dầu ngô, dầu đậu phộng, và các alkyl este của chúng), keton (xyclohexanon, axeton, axetophenon, isophoron, etyl amyl keton, v.v.), amit (N, N-dimetylformamit, N-metylpyrrolidon, v.v.), sulfoxit và sulfon (dimetylsulfoxit, dimetyl-sulfon, v.v.) và các hỗn hợp của chúng.

Chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng là muối natri, muối canxi, muối kali, trietylamin hoặc trietanolin của alkyl-naphtalensulfonat, polynaphtalensulfonat, alkylsulfonat, aryl-sulfonat, alkylarylsulfonat, polycarboxylat, sulfosuccinat, alkylsulfosuccinat, lignin sulfonat, alkyl sulfat; và rượu béo được polyetoxyl hóa lại, alkyl phenol được polyetoxyl hóa, este của sorbitol được polyetoxyl hóa, polypropoxy được polyetoxyl hóa (copolyme khối), có thể được sử dụng.

Chế phẩm cũng có thể chứa các chất phụ gia đặc hiệu nhằm các mục đích cụ thể, ví dụ, chất chống đông như propylen glycol, hoặc chất kết dính như gôm arabic, rượu polyvinyl, polyvinylpyrrolidon, v.v..

Nếu muốn, các thành phần hoạt tính khác tương thích với [A] và [B] có thể được bổ sung vào chế phẩm, như, ví dụ, các hợp chất diệt nấm hoặc diệt côn trùng khác khác với các thành phần [B] nêu trên, chất điều hòa thực vật, kháng sinh, thuốc diệt nấm, phân bón và/hoặc các hỗn hợp của chúng.

Các ví dụ về thuốc diệt nấm, khác với các thành phần [B], mà có thể có trong chế phẩm hiệp đồng theo sáng chế được liệt kê dưới đây với tên ISO quốc tế của chúng: ampropylfos, anilazin, benodanil, blasticidin-S, bupirimat, buthiobat, chinomethionat, cloneb, clozolinat, debacarb, diclon, diclobutrazol, diclomezin, dicloran, dicloxymet, dietofencarb, diflumentorim, dimethirimol, dinocap, dipyrithion, ditalimfos, dithianon, edifenphos, ethirimol, etoxyquin, etridiazol, fenaminsulf, fenapanil, fenarimol, fenfuram, fenoxanil, fentin, ferbam, ferimzon, floimit, fluotrimazol, flusulfamit, hymexazol, hydroxy-quinolin sulfat, iprobenfos, isoprothiolan, kasugamycin, mancopper, mebenil, mepronil, meptyldinocap, methfuroxam, metiram, metsulfovax, natamycin, nitrothal-isopropyl, nuarimol, ofurac, oxadixyl, pefurazoat, penxycuron, pentaclofenol và các muối của nó, phtalua, piperalin, polyoxin, propamocarb, prothiocarb, pyracarbolit, pyrazophos, pyribencarb, pyrifenox, pyroquilon, pyroxyfu, quinaxetol, quinazamit, quintozen, streptomycin, thiadiflo, thixyofen, thiram, tioxymit, tolclofos-metyl, triarimol, triazbutil, triazoxit, trixyclozol, triforin, validamycin, vinclozolin, ziram, sulfua.

Tổng nồng độ của thành phần [A] và [B] trong chế phẩm có thể thay đổi nằm trong một khoảng rộng; thường là nằm trong khoảng từ 1% đến 99% trọng lượng so với tổng trọng lượng chế phẩm, tốt hơn là, từ 5% đến 90% trọng lượng so với tổng trọng lượng chế phẩm.

Để bảo vệ cây trồng nông nghiệp, chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng vào bộ phận bất kỳ của cây, hoặc trên hạt trước khi gieo, hoặc trên đất mà cây sinh trưởng.

Do đó, mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp, bao gồm áp dụng liều hữu hiệu của ít nhất một chế phẩm diệt nấm hiệp đồng có dạng nêu trên vào một hoặc nhiều bộ phận của cây cần được bảo vệ (ví dụ, trên cành chiết, lá, quả, thân, nhánh, rễ) và/hoặc trên hạt của cây này trước khi gieo, và/hoặc trên đất mà cây này sinh trưởng.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp phòng trừ các côn trùng gây hại ở cây trồng nông nghiệp mà bao gồm áp dụng liều hữu hiệu của ít nhất một chế phẩm diệt nấm hiệp đồng bao gồm ít nhất hợp chất có công thức (I) và ít nhất một hợp chất diệt côn trùng được chọn từ một hoặc nhiều nhóm hợp chất từ xix đến xxv nêu trên,

vào một hoặc nhiều bộ phận của cây cần được bảo vệ (ví dụ, trên cành chiết, lá, quả, thân, cành, rễ) và/hoặc trên hạt của cây trước khi gieo, và/hoặc trên đất mà cây sinh trưởng.

Cách áp dụng được ưu tiên đối với chế phẩm bao gồm hợp chất (I) và ít nhất một hợp chất diệt côn trùng được chọn từ một hoặc nhiều nhóm hợp chất từ xix đến xxv là phủ lên hạt.

Tổng lượng thành phần [A] và [B] được áp dụng để thu được tác dụng được mong muốn có thể thay đổi theo các yếu tố khác nhau như, ví dụ, các hợp chất được sử dụng, cây trồng được bảo quản, loại mầm bệnh hoặc côn trùng, mức độ lây nhiễm, điều kiện môi trường, phương pháp áp dụng, chế phẩm được sử dụng.

Liều tổng cộng các thành phần [A] và [B] nằm trong khoảng từ 10g đến 5kg/hecta cây trồng nông nghiệp thường tạo ra đủ tác dụng phòng trừ.

Các ví dụ sau được thực hiện nhằm giúp hiểu rõ hơn sáng chế, nên được coi là dùng để minh họa và không giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế 3-diflometyl-N-(7-flo-1,1,3-trimetyl-4-indanyl)-1-metyl-4-pyrazolcarboxamit (I)

Nhỏ giọt 40g dung dịch 3-(diflometyl)-1-metyl-1H-pyrazol-4-carbonyl cclorua [hợp chất có công thức (III); MW 194,5] trong 40ml dicloetan ở nhiệt độ trong phòng vào 34g dung dịch 6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin [hợp chất có công thức (V); MW 193] và 30ml trietylamin trong 200ml dicloetan.

Sau khi khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ hồi lưu, rót hỗn hợp phản ứng trong nước (1,2 l) và chiết bằng dicloetan. Rửa lớp hữu cơ bằng axit hydrocloric chứa nước 10%, làm khan bằng natri sulfat, cô đặc trong môi trường chân không để tạo ra 58g sản phẩm thô dạng rắn tương ứng với N-(3-diflometyl-1-metyl-1H-4-pyrazolcarbonyl)-6-flo-2,2,4-trimetyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin [hợp chất có công thức (II); GC-khối lượng: $M^+ = 351$].

Đối với sản phẩm thô này, bổ sung 165ml axit sulfuric chứa nước 85% và sau đó gia nhiệt hỗn hợp có khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Sau khi làm nguội, rót hỗn hợp vào nước và đá, và chiết bằng diclometan. Sau đó, rửa lớp hữu cơ bằng nước,

dung dịch bão hòa của natri bicarbonat trong nước, và dung dịch bão hòa của natri clorua trong nước. Làm khan lớp hữu cơ bằng natri sulfat và cô đặc trong môi trường chân không; tinh sạch phần còn lại bằng sắc kí trên silica gel (dung môi rửa giải: heptan/EtOAc 6:4) để tạo ra 48g chất rắn màu trắng có điểm nóng chảy là 147°C, tương ứng với sản phẩm được mong muốn ở dạng raxemic, (I)-RS. GC-khối lượng: $M^+ = 351$.

^1H NMR (200Mhz, CDCl_3) δ ở: 1,43 (3H,d), 1,38 (3H,s), 1,44 (3H,s), 1,66 (1H,dd), 2,21 (1H,dd), 3,38 (1H m), 3,98(3H,s), 6,81 (1H, bs), 6,95 (1H,t), 6,70(1H, m), 7,81 (1H,bs), 8,03 (1H,bs)

Ví dụ 2: Điều chế các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ của hợp chất (I).

Trộn 36,8g (1 đương lượng) 7-flo-1,1,3-trimetyl-4-aminoindan raxemic [hợp chất (IV)] và 14,3g (0,5 đương lượng) axit D-(2S,3S)-(-)-tatric trong metanol (30ml) và gia nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ.

Để nguội hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng; phần kết tủa được tạo ra và giữ hỗn hợp trong một đêm ở nhiệt độ 4°C. Lọc chất rắn được tạo ra, rửa bằng một lượng nhỏ metanol và tái kết tinh khỏi metanol sáu lần để tạo ra 14,8g chất rắn màu không trắng, tương ứng với 7-flo-1,1,3-trimetyl-4-aminoindan D-tatrat.

Bổ sung dung dịch natri hydroxit chứa nước 5% vào muối cho đến khi độ pH > 10, và chiết hỗn hợp ba lần bằng dietyl ete. Rửa lớp hữu cơ đã được gom lại bằng nước và nước muối. Sau đó, làm khô trên Na_2SO_4 và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 6,38g (-)-4-amin-7-flo-1,1,3-trimetylinan như là bột màu trắng (sản lượng 17%); lượng chất đồng phân đối ảnh dư (e.e.) > 99% (HPLC).

Bổ sung từng giọt 600mg dung dịch axit 3-diflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxylic [hợp chất (III)] và lượng xúc tác N,N-dimetylformamit trong diclometan (7mL), 450mg thionyl clorua. Hồi lưu hỗn hợp trong 2 giờ. Giám sát phản ứng bằng GC/MS. Làm bay hơi dung môi trong môi trường chân không. Sử dụng clorua axit thô thu được ở bước tiếp theo.

Bổ sung từng giọt dung dịch 3-diflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carbonyl clorua thô trong dicloetan (6mL) trong 10 phút, trong môi trường nitơ, vào 660mg dung dịch (-)-4-amin-7-flo-1,1,3-trimetylinan, lượng xúc tác 4-dimetylaminpyridin

và 420mg triethylamin trong dicloetan (5mL).

Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Khi kết thúc phản ứng (giảm sát qua GC-MS), pha loãng hỗn hợp bằng diclo-metan (20mL) và làm lạnh ở nhiệt độ 0°C; bổ sung dung dịch (20mL) HCl 5%.

Tách các lớp và rửa pha hữu cơ bằng dung dịch HCl 5% (2 x 20mL), nước (2 x 20mL) và nước muối, sau đó làm khô trên Na₂SO₄. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra 1,3g chất rắn màu vàng nhạt.

Tinh sạch sản phẩm thô bằng sắc ký cột (dung môi rửa giải: heptan/EtOAc 6:4) để tạo ra 1,1g (sản lượng 92%) chất đồng phân đối ảnh tinh khiết 99,5% (-) (e.e. > 99% được xác định bằng HPLC với cột đối xứng) như là chất rắn màu trắng có điểm nóng chảy = 129-130°C.

GC-MS: M⁺ = 351; [α]_D²⁰ = - 59,5°(CHCl₃, 1g/100 ml).

Theo cách tương tự, bắt đầu từ 7-flo-1,1,3-trimetyl-4-aminoindan raxemic [hợp chất (IV)] và axit L-(2R,3R)-(+)-tatric, điều chế chất đồng phân đối ảnh tinh khiết 99,3% (+) (e.e. > 99% được xác định bằng HPLC với cột đối xứng): chất rắn màu trắng có điểm nóng chảy = 131-132°C.

GC-MS: M⁺ = 351; [α]_D²⁰ = + 60,1°(CHCl₃, 1g/100 ml).

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính "in vitro" của raxemic (I) và chất đồng phân đối ảnh chống vi sinh vật gây bệnh thực vật.

Trong điều kiện vô trùng, hòa tan raxemic dùng trong kỹ thuật (I), chất đồng phân đối ảnh (-) và (+) (được điều chế trong ví dụ 2) dùng để thử nghiệm, trong dimethylsulfoxit và pha loãng 3 lần theo từng giai đoạn để thu được đường cong ức chế sự sinh trưởng. Điều chế các dung dịch xử lý chứa nước bằng cách bổ sung nguyên liệu DMSO vào nước và trộn bằng ống hút dẫn đến 2x nồng độ xử lý cuối cùng và 2x nồng độ DMSO cuối cùng là 1,6%.

Thu gom các tấm hình thành bào tử của vi sinh vật gây bệnh thực vật trong điều kiện vô trùng trong ½ dịch nước dextroza khoai tây. Lọc các bào tử bằng vải thưa và pha loãng đến khoảng 40000 bào tử/ml. Phân ước các bào tử vào các tấm vi chuẩn có 96 lỗ ở 150 microlit bào tử trong ống nhựa/lỗ. Sau đó, xử lý các bào tử gây bệnh trong ống nhựa bằng 2x dung dịch xử lý chứa nước hoặc DMSO 1,6% để phòng trừ để tạo ra

1x nồng độ cuối cùng hoặc DMSO 0,8%. Sau đó, giữ các tấm này trong 43 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Sau 43 giờ ở nhiệt độ trong phòng, đánh giá bằng mắt thường qua kính hiển vi các tấm về sự nảy mầm của các bào tử và sự ức chế sinh trưởng. Các tấm này cũng được đo sự ức chế sinh trưởng về mặt số lượng bằng cách đo mật độ quang học trên máy ghi tấm phổ quang kế ở bước sóng 405 nanomet. Điều chỉnh mật độ quang học để hấp thu môi trường và thành phần hoạt tính bằng cách giảm số ghi 405nm đối với 2x dung dịch xử lý chứa nước hoặc dung dịch DMSO được pha loãng bằng 1/2 dịch nước dextroza khoai tây và không có bào tử.

Tính % sự ức chế sinh trưởng của thể gây bệnh thu được đối với raxemic kỹ thuật (I), chất đồng phân đối ảnh (-) và (+) theo công thức:

Phần trăm ức chế = $((1 - (OD \text{ xử lý} - OD \text{ xử lý đối chứng})) / (OD \text{ không được xử lý} - OD \text{ đối chứng không được xử lý})) \times 100$

trong đó OD xử lý là mật độ quang học ở 405nm đối với bào tử trong ống nhựa cộng dung dịch xử lý chứa nước và OD trt trống là mật độ quang học ở 405nm đối với 2x dung dịch xử lý chứa nước cộng ½ dịch dextroza khoai tây và không có bào tử và OD không được xử lý là mật độ quang học ở 405nm đối với các bào tử cộng DMSO 1,6% và OD trống không được xử lý là mật độ quang học ở 405nm đối với DMSO 1,6% cộng ½ dịch dextroza khoai tây và không có bào tử. Các trị số là trung bình của ba bản sao. Tính nồng độ của raxemic, chất đồng phân đối ảnh (-) và (+) tạo ra 50% sự ức chế sinh trưởng (pI50) bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Tính các trị số phần trăm ức chế bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 4.

Các vi sinh vật được thử nghiệm là *Botrytis cinerea* (BC), *Stagonospora nodorum* (SN) và *Magnaporthe griseae* (MG).

Các kết quả được thông báo trên bảng 1.

Bảng 1.

Hợp chất	BC pI50 (ppm)	SN pI50 (ppm)	MG pI50 (ppm)
Raxemic (I)	0,32	1,1	0,72
(-)-(I)	0,17	0,42	0,46

(+)-(I)	n.i.	72	4,6
---------	------	----	-----

n.i. (no inhibition) = không ức chế

Ví dụ 4: Xác định hoạt tính diệt nấm trong ứng dụng ngăn ngừa (5 ngày) chống *Puccinia recondita* trên lúa mỳ.

Xử lý lá của cây lúa mỳ thuộc giống Salgemma, sinh trưởng trong các bình trong môi trường có điều kiện được giữ ở nhiệt độ 20°C và độ ẩm tương đối là 70% (relative humidity-R.H.), bằng cách phun cả hai mặt của lá bằng hợp chất và chế phẩm được thử nghiệm mà phân tán trong dung dịch hydroaxetonic có axeton 20% thể tích.

Sau khi duy trì 5 ngày trong môi trường có điều kiện, phun các cây này ở cả hai mặt của lá bằng huyền phù của bào tử dính chứa nước thuộc giống *Puccinia recondita* (2mg vật cấy/ml dung dịch lây nhiễm).

Sau khi phun, giữ các cây này trong môi trường bão hòa độ ẩm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18 đến 24°C trong giai đoạn ủ nấm (1 ngày).

Sau giai đoạn này, đặt các cây trong nhà kính có R.H. là 70% và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18 đến 24 °C trong 14 ngày.

Ở cuối giai đoạn này, các triệu chứng gây bệnh bên ngoài xuất hiện và do đó có thể tiến hành đánh giá bằng mắt thường mật độ lây nhiễm. Hoạt tính diệt nấm được biểu hiện bằng phần trăm giảm diện tích lá bị ảnh hưởng so với lá của các cây không được xử lý mà được sử dụng làm đối chứng: tỷ lệ được bao gồm, làm các giới hạn, trị số 100 (đầy đủ hoạt tính; cây khỏe mạnh) và trị số 0 (không có hoạt tính; cây bị lây nhiễm hoàn toàn).

Đồng thời, đánh giá tính độc thực vật (phần trăm hoại tử lá) được cảm ứng trên cây lúa mỳ bằng cách áp dụng các sản phẩm và chế phẩm: trong trường hợp này, tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0 (không có tính độc thực vật) đến 100 (cây bị hoại tử hoàn toàn).

Trong bảng 2, các hoạt tính của raxemic (I) và chất đồng phân đối ảnh tinh khiết của hợp chất (I), được điều chế trong ví dụ 2, được thông báo.

Bảng 2

Hợp chất	Tốc độ (ppm)	% hoạt tính	% tính độc thực vật
----------	--------------	-------------	---------------------

Raxemic (I)	125	98	0
	62,5	96	0
(-)-(I)	125	100	0
	62,5	96	0
(+)-(I)	125	45	0
	62,5	20	0

Đánh giá tác dụng hiệp đồng của chế phẩm (A+B) để thử nghiệm theo công thức Colby:

$$E_t = E_A + E_B - (E_A \times E_B / 100)$$

trong đó E_t là phần trăm hiệu quả kỳ vọng đối với chế phẩm chứa hợp chất A và B ở liều $d_A + d_B$, E_A là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần A ở liều d_A , E_B là phần trăm hiệu quả quan sát được đối với thành phần B ở liều d_B .

Khi hiệu quả quan sát được đối với chế phẩm A+B (E_{A+B}) cao hơn so với hiệu quả kỳ vọng theo công thức Colby ($E_{A+B}/E_t > 1$), tác dụng hiệp đồng được xác nhận.

Ví dụ 5: Xác định tác dụng hiệp đồng “in vitro” chống vi sinh vật gây bệnh thực vật.

Trong điều kiện vô trùng, hòa tan các sản phẩm và chế phẩm được thử nghiệm trong dimethylsulfoxit, pha loãng bằng nước và bổ sung có khuấy mạnh vào thạch dextroza khoai tây, giữ trong bồn tĩnh nhiệt ở nhiệt độ 55°C. Rót các chế phẩm thạch, chứa hợp chất và chế phẩm được thử nghiệm ở tốc độ được mong muốn, vào các đĩa Petri đường kính 60mm (ba đĩa đối với mỗi sản phẩm và chế phẩm) và để nguội đến nhiệt độ môi trường.

Sau khi đông rắn môi trường thạch, đặt các đĩa thạch có đường kính 6mm và đỡ thể sợi nấm của vi sinh vật, ở tâm của các đĩa Petri; cũng cấy vi sinh vật này vào các đĩa Petri chứa thạch dextroza khoai tây không được xử lý và sử dụng làm đối chứng.

Sau khi ủ ở nhiệt độ 28°C, khi các nhóm đối chứng đã sinh trưởng vượt quá đường kính là 30mm, nhưng không chạm đến mép của các đĩa, đo đường kính của các đĩa được xử lý và không được xử lý trong nhóm sinh trưởng; tính phần trăm ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật thu được với các sản phẩm và chế phẩm theo công thức:

$$I = (1 - z_1/z_0) \times 100$$

trong đó z_1 là đường kính (trung bình của ba bản sao) của các nhóm được xử lý bằng

các hợp chất và hỗn hợp và z_0 là đường kính (trung bình của ba bản sao) của các nhóm không được xử lý.

Các vi sinh vật được thử nghiệm là *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium teres*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum*, *Venturia inaequalis*.

Đánh giá tác dụng hiệp đồng của hỗn hợp hai thành phần (A + B) ở liều ($d_A + d_B$) theo công thức Colby:

$$I_t = I_A + I_B - (I_A \times I_B / 100)$$

trong đó:

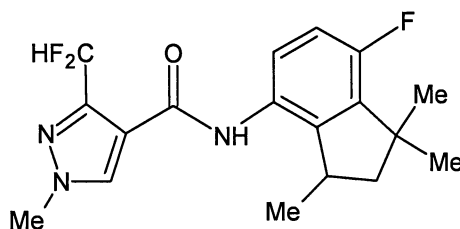
I_t là % ức chế sinh trưởng kỳ vọng đối với hỗn hợp; I_A là % ức chế sinh trưởng quan sát được đối với hợp chất A ở liều d_A ; I_B là % ức chế sinh trưởng quan sát được đối với hợp chất B ở liều d_B .

Khi % ức chế sinh trưởng quan sát được đối với chế phẩm (A+B) cao hơn so với % ức chế sinh trưởng tính được theo công thức Colby ($I_{A+B} > I_t$; $I_{A+B}/I_t > 1$), tác dụng hiệp đồng được xác nhận.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm hiệp đồng dùng để bảo vệ cây trồng nông nghiệp bao gồm:

ít nhất một thành phần (A), gồm có hợp chất có công thức (I) 3-diflometyl-N-(7-flu-1,1,3-trimetyl-4-indanyl)-1-metyl-4-pyrazolcarboxamit



(I)

trong đó, Me là nhóm methyl (CH_3 -), và

ít nhất một thành phần [B], mà thành phần này là azol được chọn từ nhóm gồm có azaconazol, bitertanol, bromuconazol, xyproconazol, difenoconazol, epoxyconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imazail, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, proclora, prothioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triflumizol, và triticonazol.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều thành phần [B] được chọn từ:

xyproconazol, difenoconazol, epoxyconazol, flutriafol, penconazol, procloraz, prothioconazol, tebuconazol, và tetraconazol.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức (I) là hỗn hợp raxemic ((I)-RS).

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức (I) được chọn từ:

(a) hỗn hợp có một trong số các chất đồng phân đối ảnh với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 51:49 đến 99,99:0,01, theo trọng lượng, và

(b) một trong hai chất đồng phân đối ảnh R ((I)-R) hoặc S ((I)-S) ở dạng gần như tinh khiết.

5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó hợp chất có công thức (I) là hỗn hợp được làm giàu chất đồng phân đối ảnh R, trong đó chất đồng phân đối ảnh R có độ tinh khiết

>99,99% trọng lượng.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa ít nhất một thành phần [A] và ít nhất một thành phần [B] nằm trong khoảng từ 1:20 đến 20:1.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm các chế phẩm được chọn từ nhóm gồm có:

RS tetraconazol;

RS tebuconazol;

RS xyproconazol;

RS difenoconazol;

RS epoxyconazol;

RS flutriafol;

RS penconazol;

RS prothioconazol;

RS procloraz;

–R₈S₂ tetraconazol;

–R₉S₁ tetraconazol; và

R tetraconazol;

trong đó:

–RS là hợp chất của thành phần [A] ở dạng hỗn hợp racemic,

–R₈S₂ là hợp chất của thành phần [A] chứa các chất đồng phân đối ảnh R và S theo tỷ lệ mol R:S = 8:2,

–R₉S₁ là hợp chất của thành phần [A] chứa các chất đồng phân đối ảnh R và S theo tỷ lệ mol R:S = 9:1, và

–R là chất đồng phân đối ảnh R của hợp chất của thành phần [A] ở dạng gần như tinh khiết.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một thành phần [A] và ít nhất một thành phần [B], kết hợp hoặc riêng rẽ, được pha loãng bằng một hoặc nhiều chất pha loãng

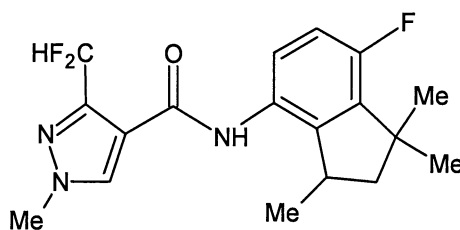
dạng rắn hoặc dạng lỏng, cùng với bổ sung một hoặc nhiều chất trong số chất hoạt động bề mặt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất ổn định, chất hỗ trợ, chất chống đông, hoặc chất kết dính.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó chế phẩm ít nhất còn bao gồm thành phần hoạt tính cơ bản, tương thích với thành phần [A] và [B], được chọn từ các chất điều hòa thực vật, kháng sinh, thuốc diệt nấm, phân bón và các hỗn hợp của chúng.

10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một thành phần [A] và ít nhất một thành phần [B], kết hợp hoặc riêng rẽ, được pha loãng bằng một hoặc nhiều chất pha loãng dạng rắn hoặc dạng lỏng, chất hoạt động bề mặt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất ổn định, chất hỗ trợ, chất chống đông, hoặc chất kết dính.

11. Chế phẩm để bảo vệ cây trồng nông nghiệp như được xác định theo điểm 1 có các thành phần hoạt tính gồm có:

ít nhất một thành phần [A], gồm có hợp chất có công thức (I) 3-diflometyl-N-(7-fluoro-1,1,3-trimethyl-4-indanyl)-1-metyl-4-pyrazolecarboxamit:



(I)

trong đó Me là nhóm methyl ($-\text{CH}_3$), và

azol được chọn từ nhóm gồm có azaconazol, bitertanol, bromuconazol, cyproconazol, difenoconazol, epoxyconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imazail, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, procloraz, prothioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triflumizol, và triticonazol.

12. Chế phẩm để bảo vệ cây trồng nông nghiệp như được xác định theo điểm 11, trong đó azol được chọn từ nhóm gồm có procloraz, prothioconazol và tetraconazol.

13. Phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp, phương pháp này bao gồm áp dụng liều hữu hiệu của chế phẩm theo điểm 1 vào cây trồng

nông nghiệp.

14. Phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp theo điểm 13, trong đó nấm gây bệnh thực vật được chọn từ các nhóm sau: các loài nấm đảm, các loài nấm nang, các loài nấm bất toàn, các loài nấm noãn: *Puccinia* spp., *Ustilago* spp., *Tilletia* spp., *Uromyces* spp., *Phakopsora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp., *Podosphaera* spp., *Uncinula* spp., *Helminthosporium* spp., *Rhynchosporium* spp., *Pyrenophora* spp., *Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp., *Septoria* spp. (*Mycosphaerella* spp.), *Venturia* spp., *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp., *Cercospora herpotrichoides*, *Colletotrichum* spp., *Pyricularia oryzae*, *Sclerotium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Plasmopara viticola*, *Peronospora* spp., *Pseudoperonospora cubensis*, *Bremia lactucae*.

15. Phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp theo điểm 13, trong đó cây trồng nông nghiệp được chọn từ: ngũ cốc, cây ăn quả, cây họ cam, cây họ đậu, cây trồng tại vườn, cây họ bầu, cây chứa dầu, cây thuốc lá, cây cà phê, cây trà, cây ca cao, củ cải đường, cây mía, cây bông.

16. Phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh thực vật ở cây trồng nông nghiệp, trong đó phương pháp này bao gồm áp dụng liều hữu hiệu của ít nhất một chế phẩm hiệp đồng theo điểm 1, vào một hoặc nhiều bộ phận của cây cần được bảo vệ và/hoặc vào hạt giống của cây trước khi gieo và/hoặc trên đất mà các cây này sinh trưởng.