Этап введения пробы осуществляют в один прием, когда образец смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или под вакуумом, или в несколько приемов, когда в капилляр последовательно вводится ведущий буферный раствор, амфолиты, образец, смешанный с амфолитами, снова амфолиты и, наконец, заключающий буферный раствор. Объем образца должен быть достаточно малым, чтобы не изменять рНградиент.

На этапе фокусирования амфолиты движутся после приложения напряжения к катоду или аноду согласно их суммарному заряду, создавая, таким образом, рН-градиент от более низкого рН (у анода) к более высокому рН (у катода). Движение каждого аналита продолжается до тех пор, пока он не достигнет рН, соответствующего его изоэлектрической точке (р*I*).

На этапе мобилизации полосы разделенных компонентов приводятся в движение в сторону детектора благодаря электроосмотическому потоку путем приложения давления после стадии фокусирования или с помощью добавления солей к флакону у катода или анода.

Достигнутое разделение, выражаемое как ΔpI , зависит от градиента $pH \frac{dpH}{dx}$, количества амфолитов, имеющих различные значения pI, молекулярного коэффициента диффузии (D), интенсивности электрического поля (E) и вариации электрофоретической подвижности аналита в зависимости от $pH \frac{-d\mu}{dpH}$:

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx}\right)}{E \left(\frac{-d\mu}{dpH}\right)}}.$$
 (12)

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке разделения, являются: